

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRUNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 12 Abbildungen



BAND 61

JUNI 1952

HEFT 1

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Abhandlungen

<i>Voigt, Gerhard E.</i> (Jena): Gewebseigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen	1
<i>Härtel, Otto</i> (Graz): Vitalfärbungsstudien an <i>Verbascum Blattaria</i>	9
<i>Lennert, Karl</i> , und <i>Günther Weitzel</i> (Göttingen): Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden	20
<i>Sandritter, Walter</i> (Frankfurt am Main): Eine quantitative färberische histochemische Bestimmungsmethode der Nucleinsäuren im Gewebe	30
<i>Lipp, Walther</i> (Graz): Die Spezifität histologischer Silberimprägnationen	38

Kleine Original-Mitteilungen

<i>Berninger, Hans</i> (Heidelberg): Eine verbesserte Methode der Einbettung anatomischer Präparate mit Celodal	44
<i>Mayer, Heinr. Th.</i> (Osnabrück): Schmelzharzmontagen. (Ein vielseitig anwendbarer Verschluß mikroskopischer Präparate)	48

Referate	50
--------------------	----

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.— zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an:** Prof. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRUNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 47 Abbildungen



BAND 61

AUGUST 1952

HEFT 2

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Kleine Original-Mitteilungen

- Kvam, Thorwald* (Trondheim, Norwegen): Eine weitere Modifikation der PASINI-schen Methode für Studien der Zahnentwicklung 65
- Petry, Gerhard* (Freiburg i. Br.): Über die Färbung elastischer Fasern mit Haematoxylin 66
- Hirsch, Th. von* (München): Histologische Schnitte im Phasenkontrastbild . . . 68
- Küster, Ernst* (Gießen): Über Vitalfärbung der Pflanzenzellen VI. Vitalfärbungen mit Haematoxylin 70
- Küster, Ernst* (Gießen): Über Vitalfärbungen der Pflanzenzellen VII. Vitalfärbungen mit Prontosil 71

Referate: 74

Abhandlungen

- Helmcke, J.-G. und W. Krieger* (Berlin-Dahlem): Feinbau der Diatomeenschalen in Einzeldarstellungen. 3. Die Gattung *Melosira* ag. 83
- Lenz, F.*: Die Elektronenmikroskopie in der Sowjetunion 92
- Lippert, W. und K. Gentil* (Frankfurt a. M.): Elektronenmikroskopische Studien über micellare Strukturen bei Schmetterlingsschuppen vom Morpho-Typ . . 95
- Schuster, Günter P. K.* (Berlin-Dahlem): Einige licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Malleomyces mallei* (Pribram) 101

Schrifttum der Elektronenmikroskopie. (3. Folge.) 109

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.— zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an:** Prof. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRÜNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 41 Abbildungen



BAND 61

OKTOBER 1952

HEFT 3

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Abhandlungen

- Petry, G.* (Freiburg i. Br.): Zur Fixation elastischer Fasern 121
- Tietz, Helmut* (Köln): Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachs-Gemischen“ unter Umgehung der Alkoholstufen, besonders nach Imbibition von leicht wasser- und lipoidlöslichen Stoffen 129
- Leonhardt, Helmut* (Erlangen): Geigyblau 536 med., ein neuer Vitalfarbstoff zum Nachweis der Blut-Gehirnschranke 137
- Köbel, Hermann* (Borstel): Die fluoreszenzmikroskopische Methode für die Darstellung und den Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis* 142

Referate 148

Abhandlungen

- Ruska, E.* (Berlin): Untersuchungen über regelbare magnetostatische Elektronenlinsen 152
- Lippert, Werner* (Frankfurt a. Main): Über die Farbabhängigkeit der Vergrößerung beim Elektronenmikroskop als störendem Fehler bei der Untersuchung dickerer Objekte 172
- Wolff, O.* (Berlin): Aufbau und Wirkungsweise des Siemens-Beschallgeräts zur Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate 180

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.— zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an:** Prof. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRUNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 66 Abbildungen



BAND 61

JANUAR 1953

HEFT 4

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Abhandlungen

- Gottschewski, G. H. M.*: Über die Anwendungsmöglichkeiten der neuen Leitz-Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach Heine 185
- Eulig, Horst-Günther und Wolfgang Mond* (Marburg/Lahn): Der Einfluß der Fixierung auf das Kernvolumen 201
- Puff, Alexander* (Marburg/Lahn): Methode zur planimetrischen Kernvolumenbestimmung an uneinheitlichem Kernmaterial 210
- Elias, Hans and Edwin H. Spanier* (Chicago): Structure of the Collagenous Tissue in the Cirrhotic Liver, a Contribution to the Geometry of Sectioning 213

Kleine Original-Mitteilungen

- Krauter, Dieter* (Stuttgart): C-Lack in der mikroskopischen Technik 222
- Jepsen-Marwedel, Hans* (Gelsenkirchen): Sinnvolle Abgrenzung von Mikro- und Makrophotographie 223
- Graumann, Walther* (Göttingen): Zur Standardisierung des Schiffschens Reagens 225

Referate 227

Abhandlungen

- Zbinden, G.* (Bern): Der hyaline Knorpel im elektronenmikroskopischen Bild 231
- Wohlfarth-Bottermann, K. E. und G. Pfefferkorn* (Münster in Westfalen): Protistenstudien I. Pro- und Nesselkapseltrichocysten der Ciliaten-Gattung PRORODON 239
- Gotthard-Helmcke-Richter*: Zuschriftenwechsel 249
- Gotthardt E.*: Klarstellung 251

Schrifttum der Elektronenmikroskopie (1. Folge) 253

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.50 zuzüglich Porto, sonst DM 6.—. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an:** Prof. Dr. h. c. Ernst Küster. (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRUNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 65 Abbildungen



BAND 61

MARZ 1953

HEFT 5

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Abhandlungen

<i>Duhm, B. und R. Gönnert</i> : Über eine Methode zum Vergleich desselben Objektes im Licht- und Elektronenmikroskop. Mit 7 Abbildungen	259
<i>Westermann, H. und G. Pfefferkorn</i> : Über Präparatveränderungen und Abbildungseffekte bei der Elektronenmikroskopie. Mit 14 Abbildungen	270
<i>Hell, A.</i> : Die Anwendung des Tontrennverfahrens für die Papierkopien elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Mit 2 Abbildungen	276
<i>Raettig, Hansjürgen</i> : Erfahrungen bei der elektronenoptischen Darstellung von Bakteriophagen mit dem Filmbewuchsverfahren. Mit 12 Abbildungen	280
<i>Baud, C. A., J. C. Morard und E. Pernoux</i> : Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Magermilchgerinnung nach der Labung. Mit 5 Abbildungen	290
<i>Dalitz, V. Ch.</i> : Abdruckverfahren zur Beobachtung von Holz im Übermikroskop. Mit 1 Abbildung	292
<i>Jahn, Brigitte</i> : Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Foraminiferenschalen. Mit 9 Abbildungen	294
<i>Lelli, Giovanni, Alberto Bonanome und Mirella Sappa</i> : Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Wand lyophilisierter Arterien. Erste Beobachtungen über die Adventitia. Mit 7 Abbildungen	298
<i>Eicke, Ruth</i> : Was können elektronenmikroskopische Bilder über den Vorgang der Verrieselung fossiler Hölzer aussagen? Mit 8 Abbildungen	302
Schrifttum der Elektronenmikroskopie (5. Folge)	306

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.—, zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an**: Prof. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRÜNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 45 Abbildungen



BAND 61

AUGUST 1953

HEFT 6

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Ernst Küster † V

Abhandlungen

<i>Ludwig, Kurt S.</i> : Zur Frage der Spezifität des histologischen Glykogennachweises durch Silbermethoden	321
<i>Schwarz, Willy und Gerda, Vester</i> : Cremolan, ein wasserlösliches Einbettungsmittel für histologische und elektronenmikroskopische Schnittpräparate . .	328
<i>Geiger, Fritz</i> : Verbesserungen am Grundschlittenmikrotom mit automatischer Objekthebung Typ 1300 der Fa. E. Leitz	333
<i>Hirsch, Th. von</i> (München): Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte	337
<i>Bode, F.</i> (Frankfurt/Main): Mikrophotographie ohne Okular	350
<i>Meyer-Arendt, Jürgen und Erica, Meyer-Arendt</i> : Die Analyse von Imbibitions- und Grenzflächenphänomenen mit dem Zylinderlinsenmikroskop	354
<i>Graumann, Walther</i> : Erfahrungen mit Bleitetraacetat als Oxydans für 1,2-Glykole	361
<i>Clemens, H. J.</i> : KARION „Merck“ — ein wasserlösliches Einschlußmittel in der histologischen Technik	364

Kleine Original-Mitteilungen

<i>Moller, Walter</i> : Die „Miproleuchte“, eine Lichtquelle für Projektionsmikroskopie	370
---	-----

Referate	373
--------------------	-----

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format 17 × 24,5 cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5.— zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an:** Prof. Dr. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

ZEITSCHRIFT
FÜR WISSENSCHAFTLICHE
MIKROSKOPIE
UND FÜR MIKROSKOPISCHE TECHNIK

BEGRUNDET VON W. J. BEHRENS

Organ der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

Unter besonderer Mitwirkung von Prof. Dr. W. J. Schmidt, Gießen
und Prof. Dr. Ernst Ruska, Berlin

herausgegeben von

Prof. Dr. Dr. h. c. E. Küster, Gießen · Prof. Dr. B. v. Borries, Düsseldorf
Prof. Dr. Helmut Ruska, Berlin

Mit 33 Abbildungen
und 5 Tafeln



BAND 61

· APRIL 1954

HEFT 7/8

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

INHALTSVERZEICHNIS

Lichtmikroskopischer Teil:

Abhandlungen

- Gössner, Wolfgang*: Die Perchlorsäure und ihre Anwendung zum histochemischen Nucleinsäurenachweis 377
- Rahn, J.*: Über den Einfluß der Fixierung und der Wässerung auf die Struktur des Lungengewebes 386
- Claussen, C. H.*: Zur Entwicklung des Binokularmikroskops 406

Kleine Original-Mitteilungen

- Hirschler, Jan †*: Eine praktische Einrichtung zum Anfertigen von Feulgen-Präparaten 414

Referate 416

Elektronenmikroskopischer Teil:

Abhandlungen

- Dettmer, Norbert, und Willy Schwarz*: Die qualitative elektronenmikroskopische Darstellung von Stoffen mit der Gruppe CHOH-CHOH . Ein Beitrag zur Elektronenfärbung 423
- Marotzke, Renate*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Substantia propria des normalen menschlichen Trommelfells 429
- Hartmann-Fahnenbrock, Margarete, und Walter Kling*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Porzellanoberflächen 439

Schrifttum der Elektronenmikroskopie (6. Folge) 448

8 Hefte (bzw. 4 Doppelhefte), die zwanglos in ungefähr 6-wöchentlichen Abständen erscheinen (Doppelhefte etwa vierteljährlich), bilden einen Band. Jedes Heft im Format $17 \times 24,5$ cm hat einen Umfang von ca. 64 Druckseiten. Preis des Heftes im Abonnement DM 5. — zuzüglich Porto, sonst DM 5.50. Die Zeitschrift wird heftweise berechnet. Bestellungen nimmt jede Buchhandlung bzw. der Verlag entgegen.

Beiträge (in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache) erbeten, **bei vorwiegend lichtmikroskopischem Inhalt an**: Prof. Dr. Dr. h. c. Ernst Küster, (16a) Gießen, Bismarckstraße 16

bei vorwiegend elektronenmikroskopischem Inhalt an: Prof. Dr.-Ing. habil. Bodo von Borries, (22a) Düsseldorf, August-Thyssen-Straße 1, oder Prof. Dr. med. habil. Helmut Ruska, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

Gewebeeigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen

Von **Gerhard E. Voigt**

Mit 5 Abbildungen

Histologische Versilberungen werden seit nunmehr 100 Jahren (C. KRAUSE) zur Darstellung von Gewebsstrukturen angewendet, doch ist es ein langer Weg gewesen, bis über die Methoden GOLGIS die Verfahren von CAJAL und BIELSCHOWSKY in zahllosen Modifikationen ihre heutige Wertschätzung gefunden haben.

Silbermethoden benutzt man sowohl zum Sichtbarmachen von Strukturen als auch zur Durchführung histochemischer Reaktionen. Die Chemie der Verfahren ist schon in zahlreichen Veröffentlichungen ihre Würdigung gefunden. So geführt vor allem LIESEGANG das Verdienst, eine umfassende und verständliche Erklärung gegeben zu haben, und nur wenige Autoren stehen in Einzelheiten dieser Ansicht entgegen (z. B. CORRENS oder SEKI).

LIESEGANG hat bekanntlich zuerst die Bekeimung des Gewebes bei der ersten Behandlung mit der Silbernitratlösung bei den BIELSCHOWSKY- und CAJAL-Methoden erkannt. Die dabei entstehenden silberhaltigen Keime sind in ihrer Wirkung mit den Belichtungskeimen der photographischen Platten zu vergleichen.

Als Beweis für seine Überlegungen hat sich LIESEGANG des klassischen Versuchs von YOUNG in der photographischen Schicht bedient.

Fixiert man eine belichtete, unentwickelte Platte und entwickelt diese anschließend, so läßt sich ein Bild nicht erzeugen. Gibt man jedoch zur Entwicklerlösung erneut ein lösliches Silbersalz (sog. physikalische Entwicklung), so resultiert an den belichteten Stellen der Platte eine Schwärzung. Durch die Belichtung entstehen also Keime, die sich beim Fixieren nicht entfernen lassen und die beim langsam gesteuerten Entwicklungsprozeß zu einer Ablagerung des gebildeten elementaren Silbers Anlaß geben. Die Gelatine der photographischen Schicht bewirkt ebenso wie ein dem physikalischen Entwickler evtl. zusätzlich beigegebenes hydrophiles Kolloid (Gummi-arabicum-Lösung) die erwünschte Verlangsamung des Reduktionsvorganges an den Silberionen. Der gleiche — wenn auch etwas schwächere Effekt — läßt sich erzielen, wenn man der Entwicklerlösung (durch Zufügen von Säure) einen p_H -Wert verleiht, bei dem das Reduktionsmittel (Hydrochinon) nicht optimal reagieren kann. Darauf beruht z. B. das Versilberungsverfahren nach NIETO.

Im histologischen Schnitt wirkt das Gewebe sowohl im Stück als auch im Schnitt als Schutzkolloid und entspricht damit der Gelatineschicht der photographischen Platte. Über diese Eigenschaft verfügt das nicht gehärtete und auch in einem geringeren Umfang das in Formol, Alkohol oder einem anderen der gebräuchlichen Flüssigkeiten gehärtete Organmaterial. Das zur Vergrößerung der bei den CAJAL-BIELSCHOWSKY-Methoden gebildeten Silberkeime benötigte elementare Silber entsteht durch die Wirkung des Reduktionsmittels auf das im Gewebe noch vorhandene, nicht zur Keimbildung verbrauchte wasserlösliche Silbersalz.

Hierzu bedarf es noch einer Klärung, in welcher Weise die im Gewebe befindlichen Silberkeime bei dem eigentlichen Versilberungsvorgang wirken. Dazu können die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse über die Chemie der Photographie herangezogen werden.

Es gibt im wesentlichen zwei Gedankengänge. So soll nach W. OSTWALD und A. BEGG sämtliches unbelichtetes Silberbromid der Photoschicht reduziert werden. Als Folge der hierdurch eintretenden Übersättigung der Lösung mit elementarem Silber bilden sich Kristalle, die sich bevorzugt an den durch Belichtung entstandenen Keimen abscheiden. Diese „Übersättigungstheorie“ hat man heute verlassen, nicht zuletzt, weil das unbelichtete Bromsilberkorn am Ende der regulär durchgeführten Entwicklung unverändert vorliegt (VOLMER).

Neuerdings sieht man den Entwicklungsprozeß als „heterogene, katalytisch beschleunigte Grenzflächenreaktion“ an (MEIDINGER). Diese Auffassung geht auf VOLMER zurück, sie hat ihre Geltung auch für die sog. physikalische Entwicklung. Die Keime beschleunigen nach dieser Theorie bei der photographischen Entwicklung die Reduktionsvorgänge lokal katalytisch. Es werden also zuerst die in der Umgebung befindlichen Silberionen zu elementarem Silber reduziert, wobei Besonderheiten in dem Kristallaufbau der Bromsilberteileichen eine Bedeutung haben (BODENSTEIN). Man kann sowohl in der Photographie als auch bei histologischen Versilberungen den Keimen selbst keinesfalls eine reduzierende Wirkung beimessen. Darin liegt nach unserer Überzeugung die Grundlage zum Verständnis des Mechanismus sämtlicher histologischer Versilberungsverfahren, wie wir das kürzlich erläutert haben.

Es ergeben sich daraus neue Gesichtspunkte für die Bewertung histochemischer Silberverfahren, z. B. Methode nach GIROUD-LEBLOND zur Darstellung des Vitamin C oder MASSON-HAMPERLSche Verfahren zum Nachweis der Argentaffinität.

Bei den Keimen ist wahrscheinlich eine besondere Beschaffenheit ihrer Oberfläche ausschlaggebend für ihre Wirksamkeit. Aus der Intensität der bei der Versilberung der Keime auftretenden Schwärzung läßt sich nicht auf die Größe der Keime schließen, wohl aber in beschränktem Umfang auf deren Zahl.

Die chemische Natur der Keime kann verschiedener Art sein. Bei den Methoden nach BIELSCHOWSKY, CAJAL usw. sind sie silberhaltig. Vielleicht ist es, ähnlich wie in der Photographie hexagonal und nicht — wie sonst üblich — regulär kristallisiertes Silber, was bereits LIESEGANG als möglich anerkannt hat. Daneben kann es sich aber auch um Silbersulfid handeln, zumal uns neuerdings bekannt ist,

daß dieses in der Photographie bei der Reifung der Kristalle und der Keimbildung eine hervorragende Bedeutung hat (MEIDINGER, AMMANN-BRASS). Fernerhin kommen die anderen Schwermetallsulfide (ROBERTS, TIMM, QUERIDO) in Betracht sowie Schwermetallcarbate (VOIGT) und höchstwahrscheinlich Erdalkalien. Außerdem spielen in ihrer chemischen Zusammensetzung nicht näher kennzeichnende Stoffe eine Rolle, die sich durch Besonderheiten im Aufbau der Oberfläche auszeichnen und, ebenso wie die anderen Keime, „Fremdkörper“ in der kolloidalen Schicht darstellen.

Im Organmaterial kann man also durch Behandlung mit verschiedenen Reagenzien Keime bilden, wobei gewebeeigene Substanzen mit diesen zugefügten Chemikalien reagieren, z. B. durch Behandlung mit löslichen Silbersalzen, Schwefelwasserstoff, Carbat, Tannin usw. Wir haben solche Stoffe (die also durch Zugabe von Chemikalien entstehen) unter dem Sammelbegriff Sekundärkeime zusammengefaßt.

LIESEGANG hat vor etwa 30 Jahren zusammen mit RIEDER versucht, Silber im Tierversuch in den Organschnitten nachzuweisen und hat sich dabei der sog. physikalischen Entwicklung bedient. Die Autoren gingen von der Ansicht aus, daß bei Vergiftung des lebenden Tieres mit Silbernitrat eine intravitale Bekeimung des Gewebe stattfinden soll. Eine sichtbare Versilberung bei der physikalischen Entwicklung der Organschnitte ist jedoch nicht gelungen. Nach dem Ausgang dieser Versuche war zu vermuten, daß es im Gewebe keine Stoffe gibt, die sich mit der physikalischen Entwicklung ohne weiteres darstellen lassen.

RENNERT hat unter Anleitung von TIMM in der Leber Neugeborener und Meerkatzen in alkoholgehärtetem Material Kupfersulfid gefunden, das bei der physikalischen Entwicklung der Organschnitte als Keim wirkt.

Damit gibt es also doch Stoffe im Gewebe, die sogar am alkoholfixierten Material Keime für die Versilberung sind. Es dürfte daneben aber noch eine ganze Reihe von Substanzen geben, die wasser- oder alkohollöslich sind und sich deshalb auf diesem Weg der Darstellung entziehen.

Für gewebeeigene Stoffe, die ohne jede chemische Behandlung bei der physikalischen Entwicklung des Schnittes wirksam sind, haben wir die Bezeichnung „Primärkeime“ vorgeschlagen.

Wir haben weitere Untersuchungen an normalem und pathologisch-anatomisch verändertem Material an sämtlichen inneren Organen durchgeführt und uns in dieser langen Untersuchungsreihe folgender Technik bedient:

Die Organschnitte werden in Alkohol fixiert und über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Die entparaffinierten Schnitte werden physikalisch entwickelt. Dazu hat sich uns folgender Entwickler bewährt: Zu 7,2 Teile 15—20%iger, gut gequollener, wäßriger Gummi-arabicum-Lösung gibt man 1,1 Teile 1,2%ige Oxalsäure und 0,3 Teile 10%ige wäßrige Silbernitratlösung. Nach kräftigem Schütteln fügt man 1,2 Teile mindestens 1 Tag altes 2%iges Hydrochinon zu. Die Lösung wird nach kräftigem Schütteln auf die in flachen Schalen befindlichen, auf Deckgläser aufgezogenen entparaffinierten Schnitte aufgegossen, nach Beendigung der Entwicklung wird unter fließendem Wasser gespült und mit 10%igem

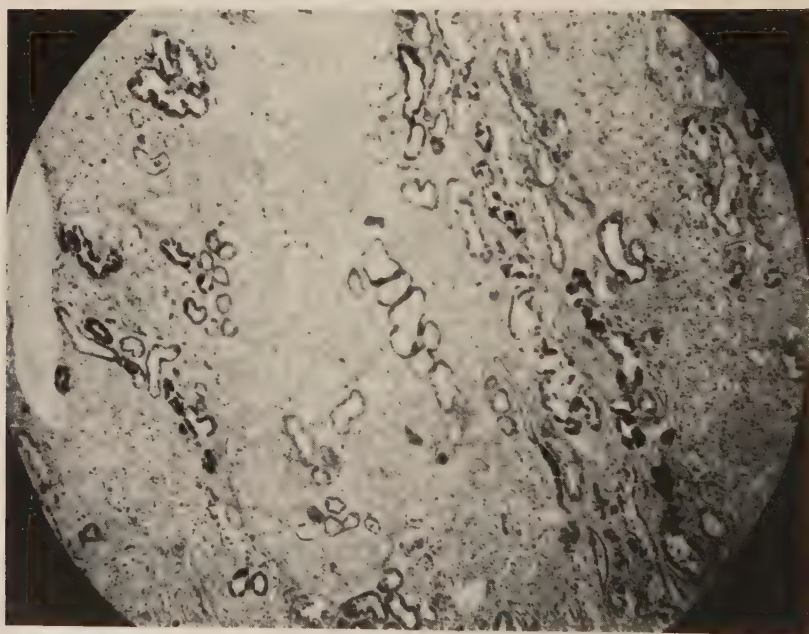
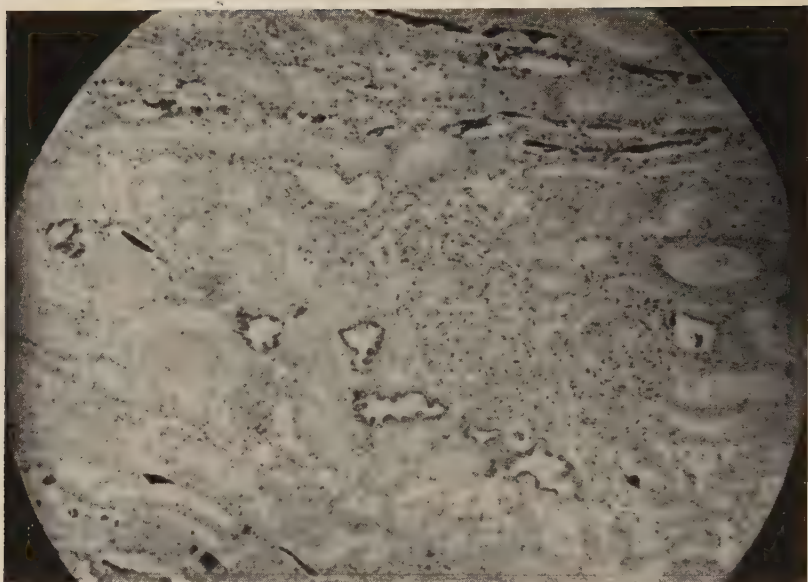


Abb. 1. Niere bei Amyloidnephrose. Physikalisch entwickelt. Kernechtrot

Abb. 2. Niere bei hochgradiger Amyloidnephrose. Physikalisch entwickelt. Kernechtrot

Natriumthiosulfat fixiert. Die Entwicklung geschieht bei Tageslicht. Die Beendigung der Entwicklung läßt sich nicht näher beschreiben, am besten kontrolliert man unter dem Mikroskop. Der Zeitpunkt hängt von dem Kolloidzustand der Gummi-arabicum-Lösung ab. Die Technik ist mitunter etwas launisch. Vorbedingung ist sauberstes Arbeiten.

Bei den Untersuchungen haben wir dann Primärkeime in krankhaft veränderten Nieren gefunden, so besonders bei Amyloid- aber auch bei gewöhnlichen Nephrosen. Es haben sich Primärkeime in manchen Fällen (meist bei Amyloidnephrosen) in den Epithelien zahlreicher gewundener und gerader Harnkanälchenanteile (Hauptstücke) sowie der abwärts liegenden Zylinder (Henlesche Schleife) als eine körnige bis schollige Schwärzung nach der Entwicklung gezeigt.

Bei dem uns in reichlicher Menge zur Verfügung stehenden Material von gewaltsam getöteten, gesunden Menschen haben wir solche Stoffe niemals finden können.

Diese Primärkeime dürften vielleicht eine nicht unerhebliche Bedeutung für die Klärung der Physiologie der Niere haben. So konnten wir Primärkeime nur in einem einzigen Falle in einzelnen Perizyten der Glomeruli, nie aber frei im Kapselraum finden. Bei der außerordentlich empfindlichen Methode hätten sich die Stoffe im Falle ihrer Anwesenheit darstellen lassen müssen. Eine Ausscheidung in ihrer endgültigen Zusammensetzung durch die Glomeruli hindurch ist deshalb unwahrscheinlich.

In manchen Fällen sind nur einzelne, nicht benachbarte Nephrone betroffen. Wir halten es deshalb nicht für möglich, daß die als Primärkeime bezeichneten Stoffe, auf dem Blut- oder Lymphweg kommend, direkt in das Epithel der Harnkanälchen hinein abgegeben werden, da sonst entsprechend dem Verlauf der Blut- und Lymphgefäße an nebeneinander befindlichen Kanälchen Primärkeime sein müßten. Das ist sehr häufig nicht der Fall. Aus diesem Grunde möchten wir annehmen, daß nicht versilberbare Vorstufen in den jeweils tätigen Glomeruli ausgeschieden werden und in den Epithelien der Harnkanälchen nach Rückresorption mit dort befindlichen Stoffen sich umsetzen. Das Umsetzungsprodukt dürften die Primärkeime sein, die auch den Zylindern beigegeben werden. Es wäre möglich, daß es sich bei den im Glomerulus abgegebenen Stoffen um schwefelhaltige Verbindungen handelt. Wir haben bei der Anwendung des Sulfidsilberverfahrens nach F. TIMM in den Hauptstück-Epithelien sämtlicher Tubuli solcher krankhaft veränderter Nieren, aber auch in den Perizyten der Glomeruli eine auffallend starke schwärzende Versilberung erhalten. Möglicherweise stellen die mit der letztgenannten Methode nachzuweisenden Stoffe intravital eine Störung des Kolloidzustandes des Plasmas der Epithelzellen der Tubuli dar und damit auch die Ursache für die funktionellen und morphologischen Veränderungen.

Weitere Primärkeime haben wir regelmäßig bei der miliaren Tuberkulose der Lunge nachweisen können. Sie finden sich im Bereiche der Epitheloidzellen sowie in den LANGHANSschen Riesenzellen und im Zentrum von Rundzellenanhäufungen.

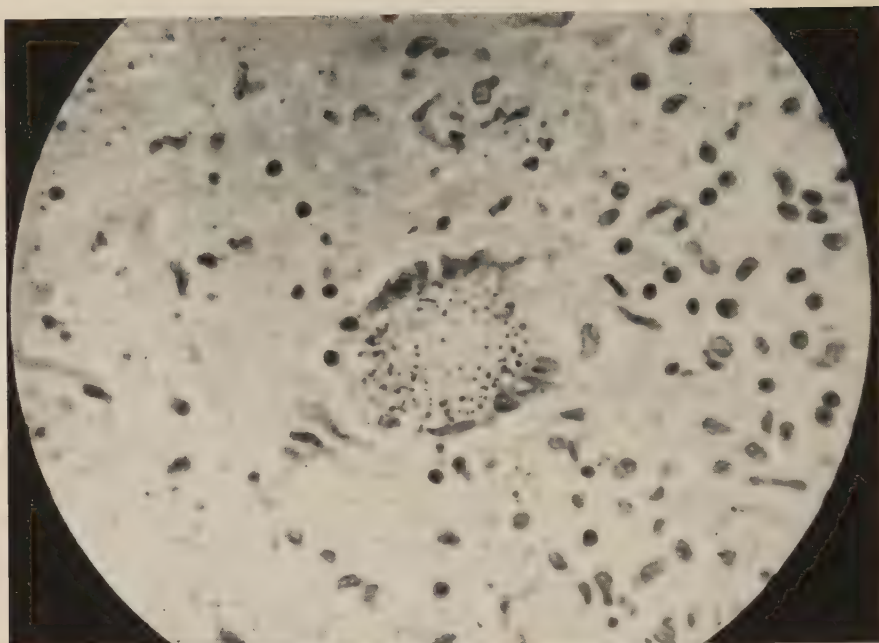


Abb. 3. LANGHANSSche Riesenzelle. Lunge. Mensch. Physikalisch entwickelt. Kernechtrot

Vom kolloidchemischen Standpunkt aus können die LANGHANSSchen Riesenzellen in der Lunge als Fremdkörperriesenzellen angesehen werden. Der Nachweis solcher Primärkeime ist bisher nicht in den LANGHANSSchen Riesenzellen bei Tuberkulose in anderen Organen gelungen. Da bei der Beurteilung der schwarzen Silberkörnchen im histologischen Schnitt das Kohlepigment stört, haben wir uns auch des Tierversuchs am Kaninchen bedient.

Bei dem Tier hat sich im optisch leeren Schnitt sowohl im Hell- als auch im Dunkelfeld Kohlepigment nicht nachweisen lassen. Das Ergebnis mit der physikalischen Entwicklung ist an der tierischen Lunge das gleiche wie an der menschlichen.

In der Lunge finden sich Primärkeime fernerhin in abgestoßenen Alveolarepithelien, also an Stellen, wo angeblich Vitamin C gespeichert werden soll (TONUTTI und WALRAFF).

Nach unserer Meinung stellt die Methode GIROUD-LEBLOND nichts anderes dar als eine physikalische Entwicklung, bei der Ascorbinsäure das wäßrig gelöste Reduktionsmittel ist. Durch die saure Reaktion des Reagens (Essigsäure) wird der Reduktionsvorgang verlangsamt, das gebildete elementare Silber findet sich schließlich an den z. T. wasser- oder alkohollöslichen Keimen vor. Es soll in einer späteren Veröffentlichung hierauf noch einmal näher eingegangen werden.

Gegen unsere Ansicht über das Wesen der Primärkeime könnte eingewandt werden, es handele sich vielleicht doch um im Gewebe vorhandene, sehr stark wirkende Reduktionsmittel, die aus dem Entwickler schneller als dies das

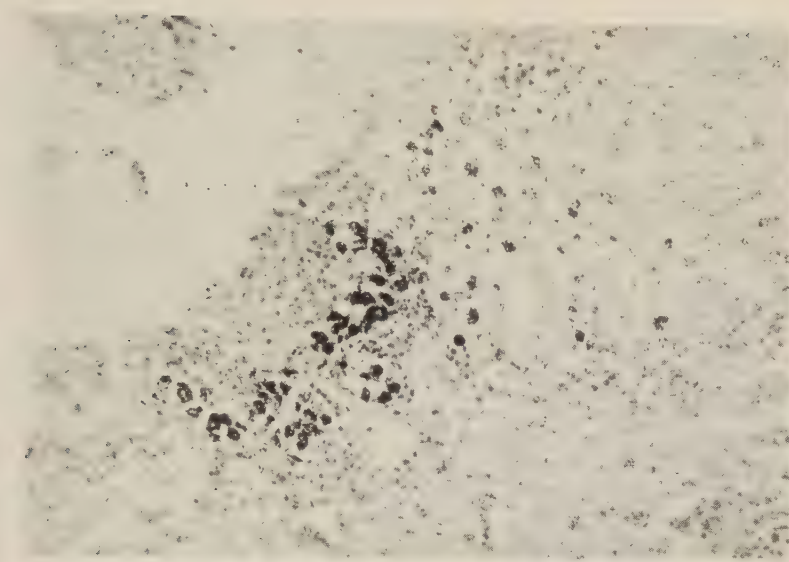


Abb. 4. Miliare Tuberkulose. Kaninchenlunge. Physikalisch entwickelt. Kernechtrot

Hydrochinon vermag — Silberionen reduzieren. Das auf diese Weise gebildete elementare Silber könnte dann den Keim für die unter dem Einfluß des Hydrochinons entstehenden Silbermengen darstellen. Gegen diese Annahme spricht aber sehr deutlich, daß die von uns beschriebenen Primärkeime bleiben, wenn die Schnitte vor der Versilberung mit einem Oxydationsmittel behandelt worden sind wie z. B. mit Ammonpersulfat.

Bei allzulange oder unter schlechtem Kolloidschutz durchgeführter physikalischer Entwicklung (sog. „Überentwicklung“) resultiert eine granuläre Versilberung des Bindegewebes, der Querstreifung der Muskulatur (besonders bei Tetanustodesfällen), des Lipofuscins, Melanins usw., wie wir das kürzlich dargelegt haben. Hier ist eine Keimentstehung durch Umsatz des Silbers aus dem Entwickler mit gewebeigenen Substanzen (Schwefel?) möglich, oder aber es sind schwächer wirksame Primärkeime im Gewebe vorhanden.

Die Keime sind je nach ihrer Zusammensetzung recht verschieden in ihrem Wirkungsgrad bei der physikalischen Entwicklung. Das ergibt sich besonders augenfällig bei einem Vergleich des Silberkeims in der LIESEGANGSchen Modifikation der

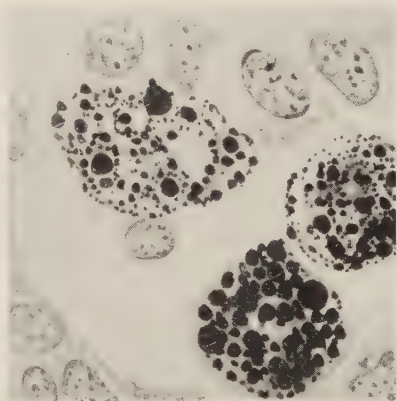


Abb. 5. Abgestoßene Alveolarepithelien. Kaninchenlunge. Physikalisch entwickelt. Kernechtrot. (Zeichnung)

CAJALSchen Methode und den Goldsulfidkeimen (ROBERTS, QUERIDO) bzw. den anderen Schwermetallsulfiden (TIMM).

Die Klärung des chemischen Aufbaues der Primärkeime im Gewebe und ihre pathologisch-physiologische Bedeutung muß der Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Schrifttum

- ABEGG, R.: Wiedem. Ann. **62**, 425, 1897; Arch. wiss. Photographie **1**, 15, (1899). — AMMANN-BRASS: Angew. Chemie **62**, 2, 43 (1950). — BODENSTEIN, M.: Die Entstehung des latenten Bildes und die Entwicklung desselben in der Photographie. Berlin (1942). — CORRENS, A. E.: Ztschr. mikr. anat. Forsch. **45**, 376 (1939). — HELCK, J.: Inaug. Diss. Jena (1944). — KRAUSE, C.: R. WAGNERS Handwörterbuch der Physiologie, Bd. 2, Braunschweig (1844). — LIESEGANG, R. E.: Kolloid Beihefte **3**, 1 (1911); Ztschr. f. wiss. Mikroskopie **42**, 448 (1925). — LIESEGANG, R. E., und W. RIEDER: Ztschr. f. wiss. Mikroskopie **38**, 334 (1921). — MEIDINGER, W.: Handbuch der wissenschaftlichen und angewandten Photographie Bd. V, Wien (1932). — NETTE: Inaug. Diss. Jena (1944). — NIETO: Ztschr. f. wiss. Mikroskopie **51**, 526 (1934). — NITZSCHE: Inaug. Diss. Jena 1944. — OSTWALD, Wi.: Lehrbuch der allgemeinen Chemie, Leipzig 1893. — QUERIDO, A.: Acta psychiatr. et neurolog. **22**, 97 (1947). — RENNERT: Inaug. Diss. Jena 1944. — ROBERTS, W. J.: Bull. d'Histol. **9**, 344 (1935). — SEKI, M.: Z. Zellforschung und mikrosk. Anatomie **30**, 529, 548 (1940). — TIMM, F.: Habil.-Schrift, Leipzig 1932, zit. nach HELCK, NETTE, NITZSCHE, RENNERT, ZAPFE. — TONUTTI und WALRAFF: Beitr. path. Anat. **103**, 78 (1939). — VOIGT, G. E.: Habil.-Schrift Jena 1951; Dtsch. Gsdh. Wes. **6**, 830 (1951); Ztschr. f. ärztl. Fortbildg. **45**, 477, (1951); Beitr. path. Anat. (im Druck). — VOLMER, M.: Ztschr. wiss. Photographie **20**, 189 (1920/21). — YOUNG: Zit. v. Angerer. Wissenschaftliche Photographie, Leipzig 1950. — ZAPFE: Inaug. Diss. Jena 1941.

[Eingegangen am 20. Oktober 1951]

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Vitalfärbungsstudien an *Verbascum Blattaria*

Von Otto Härtel

Mit 1 Textabbildung

HÄRTEL, KENDA, WEBER (1950 a, b) haben auf die eigenartigen Idioblasten und Drüsenhaare der Kelch- und Blütentragblätter von *Verbascum Blattaria* aufmerksam gemacht; sie sind insbesondere dadurch ausgezeichnet, daß ihr Inhalt die mikrochemischen Reaktionen (namentlich mit SCHIFFSchem Reagens) und Löslichkeitsverhältnisse von Azetalphosphatiden zeigt und deshalb vermutlich Plasmal enthalten dürfte. Es war nun verlockend, das Vorkommen dieses im Pflanzenreich nur gelegentlich aufgefundenen Inhaltsstoffes (l. c. 1950 b) zum Anlaß einer weiteren Untersuchung zellphysiologischer Richtung zu nehmen und die Farbstoffspeicherung dieser Organe näher zu untersuchen. In den beiden oben genannten Arbeiten ist bereits darauf hingewiesen worden, daß die nach Anfärbung mit Neutralrot auftretende gelb- bis ziegelrote Fluoreszenz auf die Festlegung eines Teiles des Farbstoffes in der lipoiden Phase hindeutet, da Neutralrot in lipoider Lösung resp. in Lipoidlösungsmitteln gelb fluoresziert. Dieser Befund wird durch weitere Färbungen bestätigt, von denen nachstehend berichtet wird.

1. Fluorochromierungsversuche

Fassen wir zunächst die Drüsenhaare ins Auge, so ergeben sich nach Behandlung mit typischen Fluorochromen eindrucksvolle, aber auch recht vielfältige Bilder. Als erstes sei das Verhalten der Haare zu dem heute wohl am meisten studierten und in seinen Eigenschaften bestbekannten Fluorochrom, dem Acridinorange (STRUGGER 1940, 1948) angeführt. Färbt man bei neutraler Reaktion mit Farblösungen 1 : 10000, so ist der Ausfall der Behandlung sehr wechselnd. In der eingangs zitierten Arbeit (1950 a) wurde bereits erwähnt, daß die Haare mit einer sehr derben und nur wenig durchlässigen Kutikula bedeckt sind, die dem Eindringen von Farbstoffen ein bedeutendes Hindernis entgegenstellt. Am unverletzten Haar bzw. in größerer Entfernung von der Abriß-Stelle des Blattes tritt daher auch nach vier- und mehrstündiger Behandlung mit der Farblösung kaum Anfärbung ein. Die Stielzelle fluoresziert überhaupt nicht, die Halszelle weist eine scharfe, deutlich hellgelbe Kontur, die jedenfalls der Sekundärfluoreszenz der Kutikula entspricht (vgl. HÄRTEL 1951), auf; das Köpfchen erscheint bestenfalls nur schwach grünlich, während in den sekretgefüllten Raum unter der blasig aufgewölbten Kutikula überhaupt kein Fluorochrom eindringen kann, er leuchtet

lediglich in schwach blauer Eigenfluoreszenz. Die Möglichkeit der Farbstoffspeicherung im Sekret ist jedoch vorhanden, da dieses an Haaren, deren Kutikula geplatzt und das Sekret außen herabgelaufen ist, grellgelb bis gleißend rot aufleuchtet. Die Hemmung der Färbung muß demnach in der Kutikula liegen, was auch die Haare in unmittelbarer Nähe des Schnitttrandes beweisen. Hier fluoresziert die Stielzelle in der Regel gelbgrün bis kupferrot, desgleichen die Halszelle; das Köpfchen speichert das Fluorochrom in etwas geringerem Maße, es erscheint schwach gelbgrün bis rötlich, während das Sekret unter der gespannten Kutikula gleich dem freien grellgelb fluoresziert. Daß die Sekundärfluoreszenz des Sekretes gelegentlich ausbleiben kann, spricht gleich dem Umstand, daß die Fluoreszenzintensität von der Stielzelle zum Köpfchen hin abnimmt, dafür, daß das Fluorochrom nur durch das Blattgewebe in das Haar aufgestiegen sein kann. Den Übergang von der gelbgrünen zur roten Fluoreszenz können wir wohl mit Konzentrationsmetachromasie (STRUGGER 1940, 1948) erklären, zumal der auftretende Farbton, wenigstens im neutralen Bereich, von der Zeitdauer der Fluorochromeinwirkung abhängt und allmählich von gelb nach rot übergeht.

Im alkalischen Bereich (p_H 8,5—9) ist das Bild im wesentlichen ähnlich; die Stielzelle leuchtet grüngelb, die Halszelle namentlich in Schnitttrandnähe oft rötlich, was wieder als Anzeichen einer stärkeren Speicherung angesehen werden darf. Das Köpfchen fluoresziert nur schwach grünlich, während die Kutikula sowohl an schnittrand-fernen wie auch an -nahen Haaren grellgelb aufleuchtet. Sekretraum und Sekret verhalten sich wie im neutralen Bereich.

Aus dem geschilderten Verhalten können wir demnach entnehmen, daß das Fluorochrom vorwiegend in molekularer (gelb bis gelbgrün fluoreszierender) Form, also in lipoider Phase, gespeichert wird. Als zweite Beobachtung müssen wir festhalten, daß die Kutikula des Haares außerordentlich dicht und für den Farbstoff impermeabel ist, so daß er nur auf dem Umweg über das Mesophyll in das Haar eindringen kann; nur gelegentlich kann auch eine geringe Farbstoffaufnahme durch die Kutikula der Stielzelle, insbesondere aus alkalischer Lösung, beobachtet werden, was mit der bereits früher gemachten Feststellung, daß die Dichte der Kutikula vom Köpfchen zur Stielzelle hin abnimmt, in Einklang steht (HÄRTEL, KENDA, WEBER 1950 a). Knicke, unsichtbare Risse u. dgl. beseitigen natürlich diese Hindernisse und führen so zu recht wechselvollen Bildern, die jedoch als Artefakte zu deuten sind. Denn trotz aller Verschiedenheit im Ausfall der Färbung gehorcht die Fluoreszenz bzw. die Farbstoffspeicherung der einzelnen, das Drüsenhaar aufbauenden Zellen einer gewissen Regelmäßigkeit. Vor allem erscheint die Halszelle in der Regel in einem helleren und auch qualitativ anderen Farbton als die Stielzelle einerseits, die Köpfchenzellen andererseits, ihre Fluoreszenz gleicht mehr der des Inhalts des Sekretraumes, sofern dieser Fluorochrom speichern konnte; auch primär fluoresziert die Halszelle häufig in einem intensiveren Blau als die benachbarten Zellen. Eine Gelbfluoreszenz der Köpfchen geht in der Regel von der Membran bzw. der Kutikula aus, während der Zellinhalt in trübgrüner bis schwach gelbgrüner Fluoreszenz erscheint; auch die kuppelförmig gespannte Kutikula

zeichnet sich oft als hellgelbe Kontur ab. Wenn im sauren Farbbad mit größerer Häufigkeit eine Anfärbung des Sekretraumes zu gelber Fluoreszenz beobachtet werden kann, so ist dies wohl keineswegs als Anzeichen einer erhöhten Durchlässigkeit der Kutikula anzusehen, dies widerspräche auch allen unseren bisherigen diesbezüglichen Erfahrungen (HÄRTEL 1947, 1951); die Ursache ist wohl in einer ausgiebigeren Fluorochromwanderung im Haar zu suchen, da bei saurer Reaktion in der Stiel- und Halszelle weniger Farbstoff weggespeichert wird, so daß diese Zellen dann meist nur in ihrer Eigenfluoreszenz leuchten. Auch im sauren Farbbad sind offenbar noch genügend Farbstoffmoleküle vorhanden, um allmählich eine intensivere Fluoreszenz des Sekretes zu erregen (vgl. HÖFLER, TOTH und LUHAN 1949), bzw. muß auch daran gedacht werden, daß das Acridinorange infolge der Undurchlässigkeit der Kutikula und der geringen Permeationsfähigkeit des Phosphat-Ions (als Puffer kamen Phosphatpuffer zur Anwendung) bei seiner Wanderung im Haar allmählich der Einwirkung des Puffers entzogen wird, so daß im Sekretraum normale Speicherungsbedingungen resp. reichlich Farbmoleküle vorliegen. Daß auch im sauren Bereich eine Speicherung in Schnitttrandferne ausbleibt, bestätigt das Gesagte.

Analoge Beobachtungen lassen sich auch mit Pyronin machen; namentlich in Schnitttrandnähe ergeben sich sehr farbenprächtige Bilder. Die Stielzellen fluoreszieren rotbraun, die Halszelle lila, bisweilen mit einer Beimischung eines rotbraunen Tones, während das Köpfchen wieder rotbraun bis kardinalsrot und das Sekret dunkellila bis satt ultramarin leuchtet; in günstigen Fällen gelingt es sogar, den im Sekretraum oftmals vorhandenen optisch anisotropen Körper höherer Lichtbrechung (HÄRTEL, KENDA, WEBER 1951 a) an einem mehr ins Rötliche spielenden Farbton auszunehmen; Sekret und Einschußkörper erweisen sich demnach von verschiedenem Speicherungsvermögen und damit wahrscheinlich auch von verschiedenem Chemismus. Im alkalischen Bereich treten namentlich bei verlängerter Fluorochromierung mit Pyronin reichlich Myelinfiguren auf, die lebhaft lila fluoreszieren; besonders eignet sich Pyronin „HARLECO“ (HARTMAN-LEDDON, Philadelphia), während das GRÜBLERSche Präparat bräunlichere Töne liefert. Die photographische Darstellung scheitert allerdings an der erforderlichen langen Belichtungszeit und der dabei unvermeidbaren Bewegungsunschärfe.

Sowohl mit Pyronin als auch mit Acridinorange ist an schnitttrandfernen Haaren streng nur das außerhalb der Kutikula befindliche Sekret, sei es nun als unregelmäßig geformte Masse nach Platzen der Kutikula oder als Myelinfiguren bei intakter Kuppe, fluorochromiert. Der Farbstoff ist demnach nicht imstande, durch die unverletzte Kutikula hindurchzutreten, während dies dem Sekret offenbar ohne weiteres möglich ist; ob hierfür Porenkanäle anzunehmen sind (mikroskopisch sind jedenfalls keine nachweisbar) oder ob der Durchtritt auf irgendeine andere Weise (Lösungsweg) erfolgt, bleibe dahingestellt. Der Sekretionsvorgang entspricht offenbar dem, wie er von TUNMANN (1913) für die „Fett-drüsen“ von *Salvia glutinosa* oder von ZIMMERMANN (1922) für die Cucurbitaceenhaare bzw. von FEHÉR (1923) für Harz- und Balsamdrüsen von *Populus*

beschrieben worden ist (vgl. NETOLITZKY 1932). Ein Platzen der Kutikula mit nachfolgender Regeneration, wie dies MIDDENDORFF (1927) für *Primula sinensis* angibt, konnte gleichfalls nicht beobachtet werden.

Da dem ionisierten Pyronin eine braunrote, der lipoidgelösten molekularen Phase dagegen eine ultramarinfarbene Fluoreszenz eignet (STRUGGER 1941), läßt sich aus den Bildern, die mit diesem Fluorochrom erhalten werden, der gleiche Schluß ziehen wie nach Acridinbehandlung, nämlich daß sich die Halszelle durch ein besonderes Verhalten, vielleicht bedingt durch stärkeren Lipoidgehalt, auszeichnet und ihr deshalb wohl eine besondere Rolle bei der Sekretbildung zugeschrieben werden muß. Diese Annahme wird durch den Ausfall der GIROUD-Reaktion bekräftigt. Mit diesem Reagens schwärzt sich vor allem die Halszelle; manchmal erscheint nur die Membran dunkel, oft sind im koagulierten Plasma schwarze Körnchen eingelagert, in vielen Fällen ist die ganze Zelle gleichmäßig geschwärzt. Die Membranschwärzung werden wir kaum als „resinogene Schicht“ (TSCHIRCH 1906) deuten, sondern wohl eher mit einer Verlagerung reduzierender Stoffe in die wandständigen Plasmapierten erklären. Auch die basalen Partien der Köpfchen sind vielfach geschwärzt, wobei sich kurze, allmählich verlaufende Protuberanzen in die antiklinalen Wände verfolgen lassen (Fig. 1 e). Das übrige Köpfchen reduziert das Reagens nicht oder nur schwach, dagegen heben sich die Austrittsstellen des Sekrets in den Sekretraum an den antiklinalen Wänden (vgl. HÄRTEL, KENDA, WEBER 1950 a) wieder deutlich schwarz ab (Fig. 1 f). Man kann sich des Eindrucks kaum erwehren, daß eine in den Halszellen gebildete reduzierende Substanz durch Spalten zwischen den Zellwänden der Köpfchenzellen in den Sekretraum hinaufgepreßt wird; namentlich an jungen Haaren kann man oft große Tropfen über den Austrittsporen erkennen (Fig. 1 d); sie schwärzen sich allerdings mit GIROUD nur mehr wenig oder überhaupt nicht mehr. Es scheint sich demnach um eine ziemlich leicht oxydable Substanz zu handeln. Daraus geht aber weiterhin hervor, daß die Stiel-, Hals- und Köpfchenzellen verschiedene physiologische Leistungen vollbringen und daher eine verschiedene Aktivität besitzen müssen.

Versuche mit Redox-Indikatoren

Die in Tabelle 1 angeführten Farbstoffe wurden in jeweils frischbereiteten Lösungen 1 : 2000 bei neutraler Reaktion angewendet (ihre Herkunft ist durch Indizes: 1 — HOLLBORN, 2 — GRÜBLER, 3 — MERCK, 4 — HARLECO gekennzeichnet); die Färbedauer betrug $\frac{1}{4}$ –2 Stunden. Die schwer reduzierbaren Farbstoffe wie Neutralrot ($E_0 = -0,325$ V) oder Safranin ($E_0 = -0,29$ V) färben die Haare, natürlich mit den oben (S. 10) erwähnten Einschränkungen, relativ leicht an, wobei sich bei Safranin eine nur schwache Metachromasie zwischen ziegelrot (Köpfchen) und mehr gelbrot (Stielzelle), bei Neutralrot eine solche zwischen Himbeerrot (Köpfchen) und braunrot (Hals- und z. T. Stielzellen) ergibt.

Methylenblau färbt sowohl Stiel- als auch Köpfchenzellen, läßt jedoch die Halszelle + ungefärbt, nur gelegentlich ist ein ganz schwacher rosa Schimmer in ihr wahrzunehmen. Methylenblau geht erst bei sehr hohem p_H in den molekularen

Farbstoff	rH	Stielzelle	Halszelle	Köpfchen	Sekret
Neutralrot (2)	4—7,5	braunrot	braunrot	himbeerrot	neg
Safranin (1)	2—4,5	gelbrot	ziegelrot	ziegelrot	neg
Indigosulfonate (4)		keine Anfärbung			
Methylenblau (2)	13,5—15,5	violettblau	neg	grünblau	neg
+ H ₂ O ₂		etwas dunkler	neg bis hellblau	etwas dunkler	neg
Thionin (3, 4)	15—17	rotviolett — blaugrün	fleischrot	neg — blau — violettrot	rot
+ H ₂ O ₂		+ blau	++ rot	++ blau	rot
Toluylenblau (3, 4)	16—18	neg — lila — braunrot	neg — bläulich	neg — lila — violettrot	blau
+ H ₂ O ₂		rosa — ++ rot	blauviolett — ++ blau	++ rotviolett	blau
2,6-Dichlorphenol- indophenol (3) (DPIP)	20—22,5	neg — grünlich	neg — rötlich	neg — blaugrün	rot
+ H ₂ O ₂		neg — +++ blau	rosa — ++ rot	++ blau	rot

Tabelle 1. Färbbarkeit mit Redox-Indikatoren

Die Indigosulfonate (Di- und Tetrasulfonat) besitzen eine so geringe Neigung zur vitalen Speicherung, daß sie nicht ausgewertet werden können.

Zustand, in dem es stärker lipoidlöslich wird, über; bei neutraler Reaktion läßt sich das von uns verwendete Methylenblau (GRÜBLER) mit Chloroform zu schwach rötlicher Farbe ausschütteln, die im UV-Licht gelb fluoresziert. Die gleiche Fluoreszenz läßt sich auch an den Sekreten von ausgiebig mit Methylenblau gefärbten Haaren feststellen und gelegentlich auch in den Halszellen andeutungsweise wiederfinden.

Interessanter ist die Färbung der Drüsenhaare mit Indikatorfarbstoffen leichter Reduzierbarkeit. Thionin färbt die Stielzelle rotviolett bis blaugrau, einen ähnlichen Ton nehmen auch die Köpfchen an, während die Halszellen deutlich fleischrot tingiert sind. Diese Unterschiede werden wesentlich deutlicher, wenn man dem gefärbten Präparat verdünntes Wasserstoffperoxyd zusetzt. Unter der Einwirkung des naszierenden Sauerstoffes wird die Färbung der Köpfchen kräftiger, Stiel und Köpfchen erscheinen nun in reinem Blau, die Halszelle rein rot. Eine ähnliche Vertiefung der Farbtöne war, wenn auch in erheblich schwächerem Maße, bereits an methylenblaugefärbten Haaren festzustellen. Hingegen ist dieser Effekt bei dem noch leichter reduzierbaren Toluylenblau wesentlich ausgeprägter; die Stielzelle erscheint, ähnlich dem Köpfchen ungefärbt bis lila bzw. bräunlichrot, die Halszelle dagegen ungefärbt bis bläulich. Nach H₂O₂-Zusatz werden die Farben tiefer und ausgesprochener; Stiel und Köpfchen wird nunmehr rot, die Halszelle rein blau. Oft nehmen ungefärbt erscheinende Haare erst unter der Einwirkung des Sauerstoffs die oben erwähnten Farbtöne an.

Am ausgeprägtesten ist dieser Effekt beim 2,6-Dichlorphenolindophenol. Auch nach lang ausgedehntem Aufenthalt der Blätter in der Farblösung sind die Haare nicht oder doch nur ganz wenig angefärbt, die Farben werden erst mit H_2O_2 gewissermaßen „entwickelt“; die Köpfchen sind dann gleich den Stielzellen blau, die Basiszelle ebenso wie der Sekretraum rein rot tingiert.

Diese Beobachtungen lehren ähnlich den eingangs geschilderten Versuchen nur in noch eindrucksvollere Weise, daß der Halszelle eine gewisse Sonderstellung zukommt. Den Farbumschlag zwischen Köpfchen und Halszelle von rot nach blau als p_H -Wirkung zu deuten, ist keinesfalls angängig, da abgesehen von den weit auseinanderliegenden Umschlagpunkten (bei Dichlorphenolindophenol um p_H 5,5, bei Toluylenblau unter p_H 3) die Säurefarbe beider Farbstoffe rot ist, die mit Toluylenblau gefärbten Haare dagegen eine der DPIP-Färbung inverse Farbverteilung aufweisen. Das Thionin vollends bleibt im physiologischen p_H -Bereich gleichmäßig blau und wird im stark alkalischen Milieu rot, während es innerhalb des Drüsenhaares die gleiche Farbstoffverteilung wie das Dichlorphenol zeigt. Eine Erklärung für dieses Verhalten können wir jedoch aus den Löslichkeitsverhältnissen der Farbstoffe ableiten.

Dichlorphenolindophenol: Kapillarprobe: saurerer Farbstoff. Bis p_H 3 rot, p_H 4—5 violett, ab p_H 6 blau.

Ausschüttelung mit Chloroform: Bis p_H 4 nahezu quantitativ mit roter Farbe löslich, p_H 5—6 der größere Teil, p_H 7 zum kleinen Teil (rosa) löslich.

Ausschüttelung mit Benzol + Ölsäure: Bis p_H 7 quantitativ rot, über p_H 7 teilweise löslich.

Toluylenblau: Kapillarprobe: basischer Farbstoff. p_H 2 rot, p_H 3—11 blau.

Ausschüttelung mit Benzol: Bis p_H 6 unlöslich, p_H 7 zum kleinen Teil mit rosa Farbe, p_H 8 etwa zu gleichen Teilen löslich.

Ausschüttelung mit Benzol + Ölsäure: Bis p_H 7 zum größeren Teil mit blauer Farbe, über p_H 8 quantitativ mit blauer Farbe löslich.

Thionin: Kapillarprobe: basischer Farbstoff: p_H 2—9,5 blau, über p_H 10 orange bis hellrot.

Ausschüttelung mit Chloroform oder Benzol: p_H 2—6 unlöslich, p_H 7—9 mit schwach orangener Farbe, p_H 10,5 nahezu quantitativ mit orangener Farbe löslich.

Ausschüttelung mit Chloroform (Benzol) + Ölsäure: p_H 2—6 unlöslich, p_H 7 zum geringen Teil, p_H 8—11 quantitativ mit rotorangener Farbe löslich.

Auf Grund der angeführten Löslichkeitseigenschaften, die nach dem Vorbild DRAWERTS (1940) an den von uns verwendeten Farbstoffen nachgeprüft wurden, ergibt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Löslichkeit in ungesättigten Fettsäuren mit der Farbstoffspeicherung in der Halszelle; es darf daher in ihr ein größerer Gehalt an solchen Stoffen bzw. freien Säureresten vermutet werden. Die Stielzellen und die Köpfchen speichern dagegen den Farbstoff offenbar vorwiegend in ionisierter Form (z. B. besonders deutlich bei DPIP) oder ein Gemisch von ionisiertem und molekularem Farbstoff (z. B. Mischfarbe zwischen rot und blau - lila nach Färbung mit Toluylenblau). Da nun das Sekret ähnliche farbstoffspeichernde Eigenschaften wie die Halszelle zeigt, muß aus dem Färbungsausfall geschlossen werden, daß wenigstens ein Teil des Sekretes (es sei in diesem Zusammenhang nochmals an dessen Zweiphasigkeit erinnert) nicht durch die Köpfchenzellen, sondern bereits in der Halszelle gebildet werden muß und dann

durch die auch auf mikrochemischem Wege (GIROUD-Reaktion) dargestellten Kanälchen in den Sekretraum gepreßt wird.

In die gleiche Richtung weisen auch Beobachtungen an jungen Stadien der Drüsenhaare. Die erste Zellwand ist periklin orientiert, es scheiden sich so zunächst eine Köpfchenzelle, Hals- und Stielzelle, die sich alsbald stärker in die Länge streckt (Abb. 1a). Die Köpfchenzelle wird hierauf durch antiklinale Teilungen mehrzellig (vgl. Abb. 1b, c). Färbt man nun jüngste Stadien (entsprechend etwa Abb. 1b) mit einem der leichter reduzierbaren Farbstoffe, also Toluylenblau oder

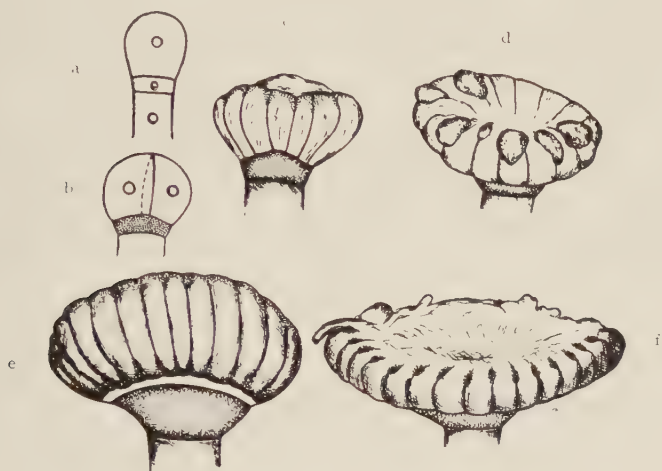


Abb. 1. Drüsenhaare von *Verbascum Blattaria* in verschiedenen Entwicklungsstadien, mit GIROUD'schem Reagens behandelt (Schwärzung durch Punktierung angedeutet); bei b und c entspricht die Punktierung gleichzeitig der Lokalisation der positiven SCHIFF'schen Reaktion. Näheres vgl. Text.

Dichlorphenolindophenol und setzt hernach H_2O_2 zu, so nimmt die Halszelle im ersten Falle eine deutlich blaue, im zweiten dagegen eine rote Farbe an, während das Köpfchen erst wesentlich später, nämlich im mehrzelligen Stadium, Farbstoff in seiner ionisierten Form (rot, bzw. blau) zu speichern beginnt. Mit GIROUD-Reagenz tritt nur in der Basiszelle Reduktion auf, ähnlich dem Reaktionsausfall an älteren Haaren. Die SCHIFF'sche Reaktion ist an derart jungen Stadien der Drüsenhaare gleichfalls nur in der Halszelle positiv; im Laufe der weiteren Entwicklung des Haares wird dann die Stielzelle und erst zuletzt das Köpfchen durch das Reagens gerötet. Da das Sekret gleichfalls die SCHIFF'sche Aldehydreaktion gibt (HÄRTEL, KENDA, WEBER 1950a), bestätigen auch diese Versuche wohl die Annahme, daß die Halszelle Stoffe, die dem Sekret verwandt sind und wahrscheinlich Vorstufen darstellen, ausscheidet, und zwar zu einem früheren Zeitpunkt als in den Köpfchenzellen. Inwieweit die Köpfchenzellen selbst an der Sekretion be-

teilt sind, ob sie ein Sekret direkt in die Köpfchenmulde oder aber in die Kanäle zwischen den Antiklinalwänden ergießen, die Drüsenköpfchen demnach als „Zwischenwanddrüsen“ (DE BARY) anzusprechen wären, konnte mit den angewandten Färbemethoden nicht entschieden werden.

Auf eine zweite Beobachtung nach Färbung mit Redoxindikatoren möge noch kurz eingegangen werden. Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß die direkte Färbung mit 2,6-Dichlorphenolindophenol noch keinen oder doch nur einen außerordentlich schwachen sichtbaren Färbungseffekt liefert; erst nach Rückoxydation erscheinen die Haare gefärbt. In weniger ausgeprägtem Maße ist dies bei Toluylenblau und bei Thionin der Fall, während die Peroxydbehandlung nach Methylenblaufärbung nur eine relativ geringe Vertiefung des Farbtönen bewirkt. Die Haare besitzen demnach die Fähigkeit, den Farbstoff zu reduzieren, im Durchschnitt kann Methylenblau als Grenze angenommen werden, was einem rH von ungefähr 1 entspricht. Nach dem Ausfall der GIROUD-Reaktion muß in der Halszelle ein niedrigeres Redoxpotential angenommen werden; das auffällige Ausbleiben einer Anfärbung dieser Zelle mit Methylenblau (vgl. Tab. 1) könnte wohl z. T. damit zusammenhängen, jedoch ist ein eingehender Vergleich wegen der verschiedenen Speicherungsbedingungen in den einzelnen Zellen einerseits, der Zutrittsschwierigkeiten für den Farbstoff andererseits, außerordentlich erschwert. Desgleichen erscheinen Vergleiche mit Redoxpotentialen bekannter Systeme nicht angebracht, da diese bekanntlich p_H -abhängig sind, die Bestimmung der intrazellulären p_H -Werte aus den gleichen Gründen jedoch höchst problematisch ist, wie die Färbversuche mit Redox-Indikatoren, die zugleich p_H -Anzeiger sind, gezeigt haben und auch bereits LISON (1935) eingehend dargelegt hat.

In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Idioblasten im Mesophyll der Kelch- und Blütentragblätter zurückgegriffen. HÄRTEL, KENDA, WEBER (1950b) haben darauf hingewiesen, daß diese gewisse Farbstoffe intensiv zu speichern vermögen; insbesondere gelingt die Färbung mit Vitalneurot, mit Gentianviolett (falls die Färbung nicht zu lang ausgedehnt wird), und einigen anderen mehr oder weniger elektiv. Nun ist aber auffällig, daß das Vitalneurot, auf Grund der Kapillarprobe ein basischer Farbstoff, die Idioblasten so bevorzugt anfärbt, obgleich es innerhalb des untersuchten p_H -Bereiches (p_H 2 — etwa 12) keinerlei Löslichkeit in Chloroform oder Benzol, auch nicht nach Zugabe von Ölsäure, zeigt und sich trotzdem färberisch ähnlich verhält wie Gentianviolett, das innerhalb des physiologischen p_H -Bereichs deutlich lipoidlöslich ist (DRAWERT 1940). Es muß also der Farbstoff nicht nur in lipoider Phase als Molekül, sondern auch als Farbsalt oder Farbbase gespeichert werden können, (wobei die Frage der Permeation offen bleiben möge); das gleiche gilt für die Färbung mit Congorot und Trypanblau, also saure Farbstoffe, die die Idioblasten gleichfalls elektiv anzufärben imstande sind, im physiologischen Bereich jedoch lipoidunlöslich sind. Dementsprechend wird auch das Dichlorphenolindophenol mit blauer Farbe gespeichert, und zwar mit schönster Elektivität; nur gelegentlich finden sich Idioblasten mit rötlich-violettem Farbton. Bei längerem Aufenthalt des Präparates unter dem Deckglas ($1\frac{1}{4}$ — $1\frac{1}{2}$ Stunde genügen meist) blassen die Idioblasten allmählich aus, bis sie

völlig farblos erscheinen. Zusatz von verdünntem H_2O_2 läßt zwar die Färbung wiederkehren, doch herrschen nunmehr lila bis rosa Töne vor! Mit Toluylenblau ist dieser Effekt nicht mehr zu erhalten, der Farbstoff blaßt auch nach stundenlangem Liegen in der feuchten Kammer nicht aus. Wir haben es hier offenbar mit einer Reduktion des Farbstoffes, die durch Sauerstoffverarmung verursacht wird, zu tun (Asphyxie-Effekt); mit der Abnahme des rH beim Übergang zur intramolekularen Atmung wird das DPIP als leicht reduzierbarer Farbstoff eben noch entfärbt, wobei gleichzeitig organische Säuren gebildet werden. Diese verursachen bei Rückoxydation des Farbstoffes dessen Farbwechsel nach Rot. Das p_H im Innern der Idioblasten dürfte demnach knapp über dem Umschlagpunkt des DPIP, also etwa um p_H 6, anzunehmen sein; weiteres lassen diese Versuche auf das Vorhandensein gewisser, wenn auch vielleicht träge verlaufender, Stoffwechsel-(Respirations-)vorgänge innerhalb der Idioblasten schließen.

An den Drüsenhaaren konnte ein Asphyxie-Effekt nicht beobachtet und auch keinerlei Ansäuerung des Zellinhaltes bei Sauerstoffverarmung festgestellt werden. Die reduzierende Wirkung der Haare und der Idioblasten muß daher auf verschiedene Ursachen zurückgehen und bei den Haaren wahrscheinlich auf der Anwesenheit reduzierender Stoffe, die wohl mit der Sekretausscheidung in Zusammenhang stehen, beruhen. Jedenfalls erscheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß sich die Idioblasten zum Unterschied vom Chlorenchym und den Drüsenhaaren mit GIROUDSchem Reagens nicht schwärzen, bemerkenswert (HÄRTEL, KENDA, WEBER 1950b). Ferner muß auch auf den Umstand hingewiesen werden, daß in den Idioblasten keine Parallelität zwischen dem Ausfall der SCHIFFschen Aldehydreaktion und der Färbbarkeit, wie wir sie in den Halszellen der Drüsenhaare beobachten konnten (vgl. S. 15), besteht. Die Idioblasten der jüngsten, knapp $1\frac{1}{2}$ mm langen Kelchblätter färben sich sowohl mit Diachromen (Vitalneurot, Gentianaviolett, Dichlorphenolindophenol) als auch mit Fluorochromen (Pyronin, Acridinorange) analog den Idioblasten fertig entwickelter Blätter an, während noch keine Spur einer SCHIFFschen Reaktion zu beobachten ist. Diese wird erst positiv, wenn die Blätter etwa die doppelte Länge (etwa 3 bis 4 mm) erreicht haben. Daraus ergibt sich allerdings, daß der die SCHIFFsche Reaktion auslösende Stoff (Plasmal) kaum die unmittelbare Ursache für die Farbstoffspeicherung bzw. damit für den „vollen“ Charakter der Idioblasten (HÄRTEL, KENDA, WEBER 1950b, HÖFLER 1947) sein dürfte, es sei denn, er erwiese sich hinsichtlich seiner Affinität zu den Farbstoffen in Konzentrationen bereits wirksam, auf die das Aldehydreagens noch nicht anspricht.

Welcher Art die reduzierenden Stoffe in den Drüsenhaaren sind, kann vorderhand noch nicht eindeutig bewiesen werden. Auffällig ist immerhin, daß die Haare Methylenblau eben noch reduzieren können (vgl. S. 13) und damit etwa die gleiche Reduktionskraft, das gleiche rH wie Ascorbinsäure in neutraler wässriger Lösung besitzen; auch der positive Ausfall der GIROUDSchen Reaktion spräche für das Vorhandensein von Ascorbinsäure, um so mehr, als diese als nicht lipoidlöslicher Stoff auf die Halszelle beschränkt bleibt und nicht in den Sekretraum übertritt. Zu erwägen wäre allerdings auch, ob nicht ähnliche Redox-Potentiale bei der Bil-

dung ungesättigter Verbindungen, Fettsäuren u. dgl. (vgl. hierzu die Übereinstimmung der Löslichkeits- und Speicherungsverhältnisse der Farbstoffe, S. 14) auftreten könnten.

Die Drüsenhaare von *Verbascum Blattaria* liefern ein weiteres schönes Beispiel dafür, daß auch auf engstem Raum und geringsten Entfernungen, innerhalb eines physiologisch einheitlich erscheinenden Organs, die Zellen sich nicht nur durch ihre Form, sondern auch durch ihr zellphysiologisches Verhalten, das wiederum im Zusammenhang mit differenten Teilfunktionen und letztlich ihrem Protoplasmazustand steht, unterscheiden können; die Drüsenhaare stellen demnach einen weiteren Beitrag zu der von WEBER begründeten protoplasmatischen Anatomie dar.

Eine Untersuchung, ob sich an Drüsenhaaren anderer Pflanzen, bzw. Haaren anderer Funktionstypen, ähnliche Verhältnisse auffinden lassen, ist eingeleitet.

Zusammenfassung

Das Verhalten von Stiel-, Hals- und Köpfchenzellen der Drüsenhaare der Kelch- und Blütenragblätter von *Verbascum Blattaria* zu Farbstoffen läßt auf einen differenten Chemismus und verschiedene physiologische Leistung schließen. Halszelle und Sekret speichern dissoziierfähige Farbstoffe in molekularer Form, Köpfchen- und Stielzellen in ionisierter oder als Gemisch beider Phasen. Eine weitgehende Übereinstimmung des färberischen Verhaltens von Halszelle und Sekret lassen eine wesentliche Beteiligung ersterer an der Sekretbildung vermuten, was durch die Beobachtung des Sekretionsvorganges sowie durch das mikrochemische Verhalten (GIROUD-Reagens) noch erhärtet wird. Die Haare vermögen Redox-Indikatoren zu entfärben, ihr rH entspricht ungefähr dem der Ascorbinsäure. Die Idioblasten in den Kelch- bzw. Tragblättern besitzen eine wesentlich geringere, vorwiegend durch Asphyxie bedingte Reduktionskraft. Während in den Haaren eine Korrelation zwischen positiver SCHIFFScher Reaktion (Plasmal) und Färbbarkeit vorliegt, fehlt eine solche bei den Idioblasten. Plasmal dürfte demnach kaum die unmittelbare Ursache für die Farbstoffspeicherung in den Idioblasten bzw. Haaren und deren „vollen“ Charakters im Sinne HÖFLER's sein.

Schrifttum

- DRAWERT (1940): Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* **134**. — DRAWERT (1942): Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* **135**. — FEHÉR (1923): Über die Abscheidung von Harzbalsam auf den jungen Trieben unserer einheimischen *Populus*-Arten. *Beih. Bot. Cbl.* **39**, Abt. I. — GIROUD (1938): l'acide ascorbique dans la cellule et les tissus. *Protoplasma-Monographien* 16. — HÄRTEL (1947): Über die pflanzliche Kutikulartranspiration und ihre Beziehungen zur Membranquellbarkeit. *Sitzber. Oest. Akad. Wiss. Math.-natur. Kl. Abt. I.* **156**. — HÄRTEL (1951): Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. *Protoplasma* **40**. — HÄRTEL (1951): Die Farbstoffaufnahme durch die Kutikula. *Ebenda* (im Druck). — HÄRTEL, KENDA, WEBER (1950) a: Myelinfiguren aus Drüsenhaaren von *Verbascum Blattaria*. *Protoplasma* **39**; HÄRTEL, KENDA, WEBER (1950) b: Plasmal-Idioblasten im Mesophyll von *Verbascum Blattaria*. *Ebenda* **39**. — HEWITT (1951): Oxydation-

Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry. Edinburgh. — HÖFLER (1947): Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie **2**. — HÖFLER, TOTH u. LUHAN (1949): Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase? Protoplasma **39**. — LISON (1935): Sur la détermination de pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. „L'erreur métachromatique“. Protoplasma **24**. — MIDDENDORF (1927): Dauerbeobachtungen über den Sekretionsvorgang an Drüsenhaaren. Beitr. Biol. Pfl. **15**. — NETOLITZKY (1932): Die Pflanzenhaare. In: Handb. der Pflanzenanatomie, hgg. v. K. LINS BAUER, I. Abt. 2. T. **4**, Berlin. — STRUGGER (1940): Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung der Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jen. Ztschr. Naturwiss. **73**. — STRUGGER (1941): Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische zweifarbige Indikatoren. Flora **135**. — STRUGGER (1948): Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover. — TUNMANN (1913): zit. n. NETOLITZKY. — TSCHIRCH (1906): Die Harze und die Harzbehälter. Leipzig. — WEBER (1928): Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Protoplasma **8**. — ZIMMERMANN (1922): zit. n. NETOLITZKY.

[Eingegangen am 6. November 1951]

Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden

Von **Karl Lennert** und **Günther Weitzel**

Beim Studium der Histologie und Histochemie der Bürzeldrüse (LENNERT und WEITZEL) konnten wir Befunde erheben, die nach den bisherigen Ansichten über die morphologische und histochemische Darstellbarkeit von Fettsubstanzen nicht zu erklären waren. Z. B. zeigte es sich, daß die Doppelbrechung in der Bürzeldrüse nicht durch Cholesterinester hervorgerufen wird, wie dies KAWAMURA annimmt, sondern durch höhermolekulare Wachse (Oktadecylester). Dies konnte nicht nur durch die chemische Aufarbeitung der Bürzeldrüsenextrakte (WEITZEL und LENNERT), sondern auch durch die Einwirkung einer Reihe von Fettlösungsmitteln („lyotrope Reihe“) auf die doppelbrechende Substanz des Schnittes erwiesen werden. Dabei zeigten nämlich die Fettstoffe im Schnitt etwa die gleiche Löslichkeit wie die Wachse im Reagensglas; sie waren am besten mit Chloroform, nicht dagegen mit Aceton aus dem Schnitt herauszulösen.

Die zweite Schwierigkeit in der Deutung der histochemischen Befunde bereiteten die Ergebnisse der Nilblausulfatfärbung und der OsO_4 -Reaktion in Fetttropfen der Bürzeldrüsenrinde. Die Fetttropfen waren mit Nilblausulfat (fortan NBS) rot, mit OsO_4 aber nicht darzustellen. Nach der heute allgemein von KAUFMANN und LEHMANN übernommenen Ansicht (LISON, MONTAGNA, ROMEIS, BERG, MALLORY u. a. A.) soll das NBS nur ungesättigte Fettsäureester rot färben. Das OsO_4 erfaßt aber auch nur ungesättigte Verbindungen. Wir möchten der OsO_4 -Reaktion dabei entschieden den Vorrang geben in ihrer Zuverlässigkeit; denn sie stellt eine spezifische, chemisch definierte Reaktion auf Äthylen-Doppelbindungen und nicht etwa eine empirisch ermittelte Färbung dar. Die Skepsis, die vielfach dieser Reaktion entgegengebracht wird (LISON, MONTAGNA u. a. A.) wird immer mit den Untersuchungen von HOERR begründet. HOERR hat aber ganz einwandfrei gezeigt, daß die OsO_4 -Reaktion spezifisch für ungesättigte Verbindungen ist, die man als ungesättigte Fettstoffe ansehen darf, wenn durch die üblichen Fettfärbungsmethoden die Lipidnatur der Substanz erwiesen ist. Somit können wir sagen, daß eine negative OsO_4 -Reaktion eine ungesättigte Fettverbindung ausschließt. Folglich kann auf Grund unserer oben genannten Beobachtungen an der Bürzeldrüsenrinde die Rotfärbung mit NBS nicht spezifisch für ungesättigte Fettsäureester sein. Aus diesem Grunde versuchten wir, die Spezifität der NBS-Methode in Modellversuchen neu zu bestimmen. Wir verwandten hierzu Filtrierpapier sowie Holundermark in der von KAUFMANN und LEHMANN angegebenen Weise. Die Einwände, die z. B. von

HOERR gegen beide Methoden vorgebracht wurden, nehmen wir durchaus ernst; wir glauben aber doch, aus den Färbungsergebnissen homologer Reihen von Fettsäuren, Äthylestern, Alkoholen usw. gewisse Rückschlüsse ziehen zu dürfen auf das Verhalten der untersuchten Substanzen im Gewebe. Auch halten wir die von HOERR angegebene Methode (Durchtränkung entfetteter Nebennierenschnitte mit der zu prüfenden Fettsubstanz) keinesfalls für besser; bringt sie doch eine Fülle von neuen Fehlermöglichkeiten mit sich. Als Ergänzung färbten wir vielfach auch noch mit Sudan III bzw. Scharlachrot sowie Sudanschwarz B, um das Bild abzurufen.

Im Anschluß an die Besprechung unserer Befunde fügen wir eine Tabelle an (Nr. IV), die über die Möglichkeiten der Trennung einzelner Fettsubstanzen durch die in Deutschland gebräuchlichen Fettfärbungsmethoden Aufschluß geben soll. Als Grundlage für diese Tabelle dienten vor allem die Untersuchungen von KAUFMANN und LEHMANN, HOERR und die eigenen Befunde. Es geht daraus hervor, daß doch einige Anhaltspunkte für die Unterscheidung verschiedener Fettsubstanzen im Gewebe aus den histologischen Methoden zu gewinnen sind, wenn auch die Tatsache, daß im Gewebe vielfach Gemische von Fettsubstanzen vorliegen, eine einfache Übertragung der Modellversuche auf die Verhältnisse im Gewebe verbietet.

Die dargestellten Resultate sollen nicht zur Überschätzung der histologischen Methoden führen, sollen aber doch der allgemein verbreiteten Skepsis gegen alle Fettnachweise entgegentreten. Denn wir haben in praxi durch die letzteren einige wertvolle Hinweise erhalten, wie aus unseren histologischen Arbeiten über die Bürzeldrüse der Enten hervorgeht.

Zur Nilblausulfatfärbung

NBS wurde im Jahre 1908 von SMITH als Fettfarbstoff empfohlen. Fettsäuren sollten sich damit blau, ihre Glyceride rot färben. Seitdem erschienen eine ganze Reihe von Arbeiten, die sich mit der Spezifität dieses Farbstoffes beschäftigen (ASCHOFF, ESCHER, KAWAMURA, BOEMINGHAUS, HOLTHUSEN, KAUFMANN und LEHMANN, KLEEGER und LISON). Die einzelnen Untersucher äußern sich teils sehr optimistisch (KAWAMURA), teils vollkommen ablehnend (ESCHER) über den Wert der Methode. LISON und mit ihm zahlreiche neuere Untersucher schließen sich den Befunden von KAUFMANN und LEHMANN an und nehmen eine Zwischenstellung ein.

Gleiche Färbegergebnisse wie mit NBS konnte SMITH auch mit Neumethylenblau, Nilblau BB und Meldola's-Blau erzielen. Unabhängig von der SMITHschen Entdeckung des Nilblausulfat wurde von EISENBERG (1910) das Chlorid des Neumethylenblau GG als Fettfarbstoff empfohlen, sowie im Jahre 1911 von PELIZZI das Nilblaulorhydrat. Beide Chloride zeitigten ähnliche Färbesultate wie das Sulfat des Nilblau.

Schließlich sei der Vollständigkeit halber noch angeführt, daß NBS auch als Vitalfarbstoff verwandt wird. Bei solcher Anwendung konnte HEDENIUS z. B. blaue bis blauschwarze Granula in den neutrophilen Leukozyten und den Monozyten des Menschen nachweisen.

Zur Anwendung des Nilblausulfat als Fettfarbstoff

Als Fixierungsflüssigkeit wird allgemein Formol in 10%iger Lösung empfohlen, das aber nur 24 Std. bis wenige Tage einwirken darf, da bei längerer Aufbewahrung in Formol eine andersartige Färbung der Fette erfolgt. Die vordem rot dargestellten Fette werden blau gefärbt (BOEMINGHAUS). Dies führt BOEMINGHAUS auf die Entwicklung von Ameisensäure aus Formaldehyd zurück, wodurch eine Verseifung von Glyceriden erfolgen soll. Die Entwicklung von Säure konnte neuerdings MONTAGNA in Formol-Calcium-Lösungen zeigen, der innerhalb von 3 Wochen ein Absinken des p_H auf 4,5 beobachtete und daher eine Pufferung der Formollösungen vorschlägt.

Gefärbt werden die aus Aqua dest. aufgezogenen Gefrierschnitte (s. ROMEIS) 20 Minuten lang in einer gesättigten (weniger als 2%igen) wäßrigen NBS-Lösung. Anschließend spült man in Wasser ab und differenziert in 1%iger Essigsäure für 10–20 Minuten (KLEEGERG). Nach gründlicher Wässerung erfolgt Eindecken der Präparate in säurefreie Glyceringelatine. Die fertigen Präparate sind lichtgeschützt aufzubewahren.

Ergebnis der Färbung und ihre diagnostische Verwertbarkeit

Kerne, elastische Fasern und Bakterien färben sich blau; eine evtl. bestehende Doppelbrechung wird durch NBS nicht aufgehoben. Lipofuscin färbt sich mit NBS nach HUECK und ROULET blau an, während LUBARSCH einen mehr blaugrünlischen Farbton feststellte.

Über den Färbeeffekt der verschiedenen Fettstoffe machen die einzelnen Autoren folgende Angaben: Freie Fettsäuren werden nach SMITH, ASCHOFF, KAWAMURA tiefblau dargestellt. BOEMINGHAUS schränkte diesen Satz dahingehend ein, daß nur ungesättigte Fettsäuren (Ölsäure, Erucasäure) erfaßt würden, während Palmitinsäure u. a. ungefärbt blieben. KAUFMANN und LEHMANN bestätigten diesen Befund, maßen aber der Blaufärbung keine besondere Bedeutung bei, da auch Fettgemische ohne freie Fettsäuren (die Säurezahl ist aber nicht angegeben!) in blauem Farbton dargestellt würden. Bemerkenswert, aber unbeachtet blieben die Befunde von KAUFMANN und LEHMANN, daß die zweifach ungesättigte Sorbinsäure (Schmelzpunkt 134°!) von NBS nicht gefärbt und die Capronsäure (gesättigt! flüssig!) blau gefärbt wird. Neutralfette bzw. Glyceride sollten nach SMITH rot dargestellt werden. Dieser Satz wurde von BOEMINGHAUS und später von KAUFMANN und LEHMANN dahingehend berichtigt, daß nur ungesättigte Glyceride erfaßt würden. Die Lipoide im Sinne der Histologie (Phosphatide, Cerebroside, Cholesterin und Cholesterinester) sollten nach ASCHOFF, KAWAMURA, ZIVERT in verschiedenen Abstufungen von rot bis blau erscheinen, während nach KAUFMANN und LEHMANN die unvermischten Lipoide durch NBS nicht dargestellt werden. In eigenen Untersuchungen (LENNERT und WEITZEL) konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß flüssige Wachse durch NBS schwach rot anzufärben sind, während feste Wachse ungefärbt bleiben.

Eigene Untersuchungen

Die Versuchsanordnung für unsere Modellversuche war im einzelnen folgende: Schmale Filtrierpapierstreifen wurden mit Äther entfettet und mit einem Tropfen der zu prüfenden Substanz beschickt, sofern diese bei Zimmertemperatur flüssig war. Bei festen Stoffen erfolgte zuerst Lösen in Chloroform oder Äther, worauf nach Verdampfen des Lösungsmittels gefärbt wurde. Außerdem wurde sorgfältig entfettetes Holundermark für zahlreiche Substanzen verwendet, und zwar insbesondere für solche, deren Farbeffekte auf dem Papier nur schwer erkennbar waren. Vor allem aber diente Holundermark für zahlreiche, bei Zimmertemperatur feste Substanzen, die wir im Vakuum-Wärmeschrank nach Verflüssigung ohne Zuhilfenahme eines Lösungsmittels in die Poren des Holundermarks eindringen ließen. Auf diese Weise schalteten wir den Fehler aus, der evtl. durch die Beimengung schwer zu entfernender Lösungsmittelreste entstehen konnte (Die verwendeten Lösungsmittel färben sich im Reagensglasversuch mit NBS rot!). Die Holundermarkstückchen wurden zusammen mit der zu prüfenden Substanz bei Zimmertemperatur oder entsprechend ihrem Schmelzpunkt bei erhöhter Temperatur evakuiert. Bei Aufhebung des Unterdruckes saugten dann die Poren des Markstückchens die Substanz an. Anschließend wurden gleichmäßig 40 μ dicke Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden jeweils in einheitlicher Weise gefärbt. In NBS lagen die Schnitte und auch die Papierstreifen 20 min lang, wurden kurz in Wasser abgespült und dann 20 min lang in 1%iger Essigsäure differenziert. Als Sudan III-Lösung wurde die von DADDI angegebene benutzt und 5 min darin gefärbt. Scharlachrot ließen wir in Alkohol-Aceton-Lösung nach HERXHEIMER nur 3 min einwirken. Mit Sudanschwarz B wurde 30 min lang gefärbt. Das Ergebnis der einzelnen Methoden wurde an den Filtrierstreifen bei Tageslicht makroskopisch, bei den Holundermarkstückchen mikroskopisch gewonnen.

Ergebnisse (siehe Tab. I u. II)

1. NBS-Färbung

Intensive Blaufärbung ergaben nur freie Fettsäuren, niemals ihre Ester, auch niemals Alkohole oder Kohlenwasserstoffe. Unter den freien Fettsäuren waren nach der Papiermethode nur die flüssigen Säuren blau gefärbt, und zwar gesättigte und ungesättigte, normale und verzweigte gleichermaßen. Die deutliche Blaufärbung der normalen Fettsäuren reicht von der Kettenlänge C_6 bis C_{11} , die Fettsäure mit der geringsten Kohlenstoffzahl, die noch kräftige Blaufärbung zeigt, ist also die Capronsäure (C_6), deren Blaufärbung bereits von KAUFMANN und LEHMANN beobachtet wurde, ohne daß die Autoren dieser Tatsache irgendeine Bedeutung beimaßen. Die Holundermarkstückchen boten für die flüssigen Fettsäuren die gleichen Resultate wie die Papiermethode, die Beurteilung der Markpräparate gestaltet sich jedoch bei den höheren festen Fettsäuren nicht ganz einfach. Diese sind nämlich nur zum Teil gänzlich ungefärbt wie

Substanz	Konsistenz bei Zimmer- temperatur (24°)	Sudan III bzw. Schar- lachrot	Sudan- schwarz B	Nilblausulfat Blaufärbung	
				Papier	Holunder
a) <i>Gesättigte, normale Fettsäuren</i>					
C ₄	flüssig	neg.	neg.	(+)	(+)
C ₅	"	"	"	(+)	(+)
C ₆	"	"	"	+	+
C ₇	"	"	"	++	++
C ₈	"	"	"	++	++
C ₉	"	"	"	++	++
C ₁₀	halbfest	"	"	++	++
C ₁₁	"	"	"	++	++
C ₁₂	fest	"	(+)?	+	(+)
C ₁₃	"	—	—	+	(+)
C ₁₄	"	(+)?	(+)?	neg.	(+)
C ₁₅	"	neg.	—	"	(+)
C ₁₆	"	"	—	"	(+)
C ₁₈	"	"	—	"	(+)
b) <i>Ungesättigte Fettsäuren</i>					
Undecylensäure	halbfest	neg.	neg.	++	++
Ölsäure	flüssig	(+)	(+)	++	++
Elaidinsäure	fest	—	—	neg.	neg.
10, 12-Oktadekadiensäure	"	—	—	"	(+)
Brassidinsäure	"	—	—	"	neg.
Erucasäure	"	—	—	"	(+)
c) <i>Verzweigte Fettsäuren</i>					
2-Methyl-laurinsäure	flüssig	(+)	(+)	++	++
3-Methyl-myristinsäure	"	—	—	++	++
3, 7, 11-Trimethyl-laurinsäure	"	(+)	+	++	++
3, 7, 11, 15-Tetra- methylpalmitinsäure	"	++	++	++	++

Tabelle I. Freie Fettsäuren im Modellversuch

neg. = negativ; — = nicht geprüft; (+) = Spur oder schwach positiv; + = positiv;
++ = stark positiv.

bei der Papiermethode. Mehrere feste Fettsäuren (in Tabelle I, letzte Spalte rechts, mit (+) angezeigt) liegen in den Maschen des Holundermarks nur zum Teil als farblose Kristalle vor, zwischen welchen mehr oder weniger kräftig blau gefärbte, unregelmäßig bizarre, gelegentlich sternförmige Gebilde zu erkennen sind. Die festen (gesättigten und ungesättigten) Fettsäuren werden also nach den Ergebnissen der einen Methode nicht, nach denjenigen der anderen Methode nur partiell und schwächer gefärbt. Somit können wir die Behauptung von BOEMINGHAUS, daß nur ungesättigte Fettsäuren durch NBS erfaßt würden, nicht bekräftigen. Vielmehr werden offensichtlich alle flüssigen Fettsäuren und diejenigen, die sich bei der Temperatur der Färbung wenige Grade unter ihrem Schmelzpunkt befinden, mit NBS kräftig blau gefärbt, wobei es ganz gleichgültig ist, ob sie gesättigt oder ungesättigt sind. Unsere Färberesultate, die ausschließlich an

Äthylester von:	Konsistenz des Esters bei Zimmer-temperatur (24°)	Sudan III bzw. Scharlach-rot	Sudan-schwarz B	Nilblau-sulfat Rot-färbung
n-Pentansäure	flüssig	neg.	neg.	neg.
n-Hexansäure	„	„	„	„
n-Heptansäure	„	„	„	(+)
n-Oktansäure	„	„	„	+
n-Nonansäure	„	„	„	+
n-Dekansäure	„	„	($\frac{+}{-}$)	++
n-Undekansäure	„	—	—	+
n-Dodekansäure	„	—	—	+
n-Tridekansäure	„	—	—	+
n-Tetradekansäure	„	—	—	++
n-Pentadekansäure	„	—	—	++
n-Hexadekansäure	„	+	++	++
n-Oktadekansäure	halbfest	+	+	++
Undecylensäure	flüssig	—	—	++
2-Methyl-dekansäure	flüssig	(+)	(+)	+
5-Methyl-palmitinsäure	„	+	+	—
3, 7, 11-Trimethyl-dodekansäure	„	(+)	+	+

Tabelle II. Äthylester einiger Fettsäuren im Modellversuch.

neg. = negativ; — = nicht geprüft; (+) = Spur oder schwach positiv; + = positiv; ++ = stark positiv.

reinen Substanzen erhoben wurden, bestätigen somit die These von SMITH, wonach nur freie Fettsäuren die Blaufärbung zeigen. Untersuchungen von KAUFMANN und LEHMANN legen die Möglichkeit nahe, daß auch Gemische verschiedener Fettstoffe sich mit NBS blau darstellen. Die These von SMITH würde hierdurch aber erst dann berührt, wenn sich ein Fettgemisch mit NBS blau färben würde, welches auf Grund seiner Säurezahl mit Sicherheit keine freien Fettsäuren enthält.

Wesentlich einfacher ist die Beurteilung der Rotfärbung, auch an Holundermarkpräparaten. Eine orangerote bis rosafarbene Darstellung erfolgte bei den Äthylestern der normalen (gesättigten!) Fettsäuren vom Heptansäureester an aufwärts; mit Ausnahme des Stearinsäureesters sind die Äthylester sämtlich bei Zimmertemperatur flüssig.

Den gleichen Färbeeffekt erzielten wir mit den flüssigen Äthylestern von ungesättigten und verzweigten Fettsäuren. Von den Neutralfetten waren nur die flüssigen Triglyceride im gleichen Farbton dargestellt, während feste Triglyceride, selbst das ungesättigte Glycerid der β -Eläostearinsäure, ungefärbt blieben. Das gleiche gilt für die geprüften Wachse, d. h. nur Wachse von flüssiger Konsistenz wurden rötlich gefärbt (obwohl sie keine Lückenbindungen enthielten!), feste Wachse waren nicht zu erfassen. Neu und unseres Wissens noch nicht geprüft ist das Verhalten der Alkohole gegenüber NBS. Sie färbten sich von der Ketten-

länge C_5 (Amylalkohol) bis C_{22} (Laurylalkohol) kräftig purpurrot (nicht orange- und rosafarben!), während der halb feste Tridecyl- und der feste Pentadecylalkohol neben zahlreichen ungefärbten Kristallen auch einige purpurrote Flecken erkennen ließen.

Zusammenfassend läßt sich also hinsichtlich der Rotfärbung durch NBS sagen, daß sich flüssige, bzw. dicht unter ihrem Schmelzpunkt befindliche Ester von gesättigten, ungesättigten, normalen und verzweigten Fettsäuren, flüssige Glyceride (gesättigte und ungesättigte), flüssige Wachse und Alkohole mit NBS rot färben, wobei der Farbton bei den Fettstoffen orangerot bis rosafarben, bei den Alkoholen purpurrot ist. Freie Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und Substanzen, die bei Zimmertemperatur fest sind, erfahren niemals eine einwandfreie Rotfärbung. Somit ist die allgemein herrschende Ansicht, daß die Rotfärbung mit NBS spezifisch für das Vorliegen ungesättigter Triglyceride sei, nicht mehr haltbar. Vielmehr können wir bei Rotfärbung von Fettstoffen im Schnitt den Beweis für das Vorliegen ungesättigter Fettsäureester nur dadurch erbringen, daß wir die OsO_4 -Reaktion anstellen. Nur wenn die Rotfärbung durch Nilblausulfat durch eine positive OsO_4 -Reaktion ergänzt wird, können wir auf ungesättigte Fettsäureester schließen, wobei neben Glyceriden auch flüssige Wachse und andere flüssige Fettstoffe mit ungesättigten Komponenten in Frage kommen. Die praktische Bedeutung einer solchen parallelen Anwendung von NBS-Färbung und OsO_4 -Reaktion geht aus den eingangs zitierten Bürzeldrüsenstudien hervor.

2. Sudan III bzw. Scharlachrotfärbung.

Beide Farbstoffe erfassen in der angewandten stark alkoholischen Lösung unveresterte Fettsäuren und Alkohole praktisch nicht (Ausnahme 3, 7, 11, 15-Tetramethyl-hexadecansäure) auch nicht die geprüften Kohlenwasserstoffe. Darin stimmen wir mit ESCHER überein. Dagegen werden die Äthylester der Fettsäuren, u. a. der normalen, gesättigten Fettsäuren von der Kettenlänge C_{11} (Undecylsäure) an, rötlich gefärbt. Beide Tatsachen sind von Wichtigkeit im Vergleich zur NBS-Färbung, die sowohl kürzerkettige Fettsäureester, freie Fettsäuren als auch Alkohole darzustellen gestattet. Die festen neutralen Fette und Wachse werden ebensowenig erfaßt wie bei der NBS-Färbung, desgleichen sind auch die flüssigen Triglyceride und Wachse gut färbbar mit den Sudan-Farbstoffen.

Wir kommen zu dem Schluß, daß Sudan III bzw. Scharlachrot eine wesentlich kleinere Färbbreite haben als NBS. Dieser Vorteil der NBS-Methode hat wohl nur für spezielle Untersuchungen Bedeutung, spielt aber in der alltäglichen Färbpraxis keine wesentliche Rolle, da das brillantere Bild und auch die Schnelligkeit der Ausführung in der Regel der Scharlachrotfärbung den Vorzug geben lassen. Lediglich dann, wenn noch polarisationsmikroskopische Untersuchungen an den Schnitten vorgenommen werden sollen, wird eine Indikation zur Ausführung der NBS-Methode gegeben sein, da die Sudan-Farbstoffe im Gegensatz zu NBS die doppelbrechenden Substanzen nicht erhalten.

Substanzen	Konsistenz bei Zimmer- temperatur (24°)	Sudan III bzw. Scharlach- rot	Sudan- schwarz B	Nilblau- sulfat Rot- färbung
<i>) Neutralfette</i>				
Caprylsäure-Triglyzerid . . .	flüssig	+		—
Undecylensäure-Triglyzerid .	„			+
Stearinsäure-Triglyzerid . . .	fest	(+)		neg.
β-Eläostearinsäure- Triglyzerid	„			„
Olivensöl	flüssig	+		++
Rizinusöl	„	—		+
<i>) Wachse u. dergl.</i>				
Cetylcapronat	flüssig	—		+
Cetylpalmitat (Walrat) . . .	fest	(+)	(+)	neg.
Oktadecylester der 2-Methylhexansäure . . .	flüssig	+	—	+
Oktadecylester der 4-Methylhexansäure . . .	„		—	+
Oktadecylcaprylat	fest	neg.	(—)	neg.
Oktadecylcaprinat	„	„	(—)	„
Oktadecyllaurinat	„	„	(—)	„
Oktadecylmyristinat	„	„	neg.	„
Oktadecylpalmitat	„	„	„	„
Phytylacetat	flüssig		—	+
Geranylpropionat	„			—
<i>) Alkohole</i>				
Butyl-Alkohol	flüssig	neg.	neg.	neg.
Amyl-Alkohol	„	„	„	—
Hexyl-Alkohol	„	„	„	—
Heptyl-Alkohol	„	„	(—)?	—
Oktyl-Alkohol	„	„	(+)?	+
Nonyl-Alkohol	„	„	—	—
Decyl-Alkohol	„	(+)?	—	++
Undecyl-Alkohol	„	neg.	—	—
Dodecyl-Alkohol	halbfest	„	(—)	++
Tridecyl-Alkohol	„	„	—	(+)
Tetradecyl-Alkohol	fest	„	(—)	neg.
Pentadecyl-Alkohol	„	(+)	neg.	(+)
Oktadecyl-Alkohol	„		—	neg.
Phytol	flüssig	—	+	+
Isophytol	„		—	+
3-Methyl-Cetylalkohol . . .	„		+	+
<i>) Kohlenwasserstoffe</i>				
Pentan	flüssig	neg.	neg.	neg.
Hexan	„	„	„	„
Heptan	„	„	„	„
Oktan	„	„	rötl.-violett	„
Nonan	„	„	„	„
Decan	„	(—)	„	„

Tabelle III. Naturfette, Triglyceride, Wachsester, Alkohole und Kohlenwasserstoffe bei einigen Fettfärbungen im Modellversuch.

neg. = negativ; — = nicht geprüft; (+) = Spur oder schwach positiv; + = positiv; ++ = stark positiv.

3. Sudanschwarz B.

Dieser von LISON eingeführte schwarze Farbstoff ist dem Sudan III und Scharlachrot insofern etwas überlegen, als er über die eben besprochenen Fettsubstanzen hinaus im Modellversuch noch feste Glyceride und Wachse schwach anfärbt. Außerdem werden die Alkohole der Kettenlängen C_9 — C_{14} einwandfrei blauschwarz dargestellt. Da Sudanschwarz B nach ROMEIS außerdem feinsten Fetttropfen darstellt, die den gewöhnlichen Sudan- und Scharlachrotmethoden entgehen, und da die Sudanschwarz-B-Färbung auch äußerst rasch und einfach durchführbar ist, sei diese Methode für alle histologischen Untersuchungen auf Fettsubstanzen nachdrücklich empfohlen.

Ein überraschender und merkwürdiger Befund ergibt sich noch aus Tab. III. Die Kohlenwasserstoffe C_8 , C_9 und C_{10} werden mit Sudanschwarz B als dem einzigen der geprüften Fettfarbstoffe dargestellt, und zwar metachromatisch rotviolett. Die Violett-färbung von Kohlenwasserstoffen und Paraffinen durch Sudanschwarz B wurde bereits früher von GERARD beobachtet.

Nachweismethode	Freie Fettsäuren (und Seifen)		Fettsäure- ester bzw. Glyceride	Phos- phatide	Cere- broside	Chole- sterin	Chol.- Ester	Wachse
	gesätt.	unges.	gesätt. unges.					
Sudan-Scharlachrot	neg.	neg. hängt von Lösungsmittel ab	+. +.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Nilblausulfat . . .	+	blau + alle flüssigen Säuren	+ rot + alle flüs- sigen Ester	neg.	neg.	neg.	neg.?	flüssige - feste neg.
OsO ₄	neg.	+	neg. +	(+)	(+)	(+)	(+)	neg., wenn gesättigt neg.
FISCHLERSche Fett- säurereaktion . .	meist +	meist +	neg. neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Lipoidfärbung nach SMITH-DIETRICH	neg.	neg.	neg. neg.	+	+	neg.	(+)	neg.
SCHULTZsche Cho- lesterinreaktion .	neg.	neg.	neg. neg.	neg.	neg.	+	+	neg.
Digitoninreaktion .	neg.	neg.	neg. neg.	neg.	neg.	+	neg.	neg.
Doppelbrechung .	neg.	neg.	neg. neg.	—?	—?	+	+	flüssig neg.
	+ nur wenn kristallinisch ausgefallen					schwinden bei 60°		fest + + (Lyotrop Reihe)

Tabelle IV. Zur Spezifität der gebräuchlichen Fettfärbungsmethoden
neg. = negativ; (+) = Spur oder schwach positiv; + = positiv; ++ = stark positiv

Zusammenfassung

Einige der gebräuchlichsten Fettnachweis-Methoden, insbesondere Nilblausulfat, wurden einer Nachprüfung hinsichtlich ihrer Spezifität mit zahlreichen Modells-substanzen unterzogen. Dabei zeigte es sich, daß — entgegen der herrschenden Literaturmeinung — die Rotfärbung mit Nilblausulfat nicht für Glycerid-

ungesättigter Fettsäuren charakteristisch ist, sondern daß sich alle geprüften, bei Zimmertemperatur flüssigen Fettsäureverbindungen (Äthylester, Glyceride, Wachse) mit Nilblausulfat rosa-orangerot färben, wobei es ganz gleichgültig ist, ob die Fettstoffe gesättigt oder ungesättigt sind. In Analogie dazu bleiben feste, ungesättigte Fettverbindungen ungefärbt. Eine Blaufärbung mit Nilblausulfat zeigten alle geprüften flüssigen Fettsäuren (normale ab C₆, ungesättigte und methylverzweigte), während feste Fettsäuren nicht oder nur partiell und schwächer erfaßt wurden.

Sudan III und Scharlachrot besitzen eine viel kleinere Färbebreite, Sudan-schwarz B nimmt eine Zwischenstellung zwischen Nilblausulfat und den roten Sudanfarbstoffen ein.

Auch Substanzen, die nicht zu den eigentlichen Fettstoffen gehören, können selektiv metachromatisch mit den erprobten Fettfärbungsmethoden dargestellt werden. So werden mit Nilblausulfat alle flüssigen Alkohole von C₅ an purpurrot (nicht rosarot wie die Fette!) gefärbt. Weiterhin werden mit Sudan-schwarz B die Alkohole C₉ bis C₁₅ schwarz und die Kohlenwasserstoffe C₈, C₉ und C₁₀ violett erfaßt.

In einer Tabelle (Nr. IV) wird schließlich eine Übersicht gegeben, welche Anhaltspunkte nach dem Ausfall der gebräuchlichen Fettnachweismethoden für eine Differenzierung der Fettstoffe im Gewebe gegeben sind.

Schrifttum

- ASCHOFF, L.: Beitr. path. Anat. **47**, 1 (1910). — BERG, Nils O.: Acta path. scand. Suppl. **40** (1951). — BOEMINGHAUS, H.: Beitr. path. Anat. **67**, 533 (1920). — EISENBERG, Ph.: Virchows Arch. **199**, 502 (1910). — ESCHER, H. H.: Corresp.-Bl. f. Schweiz. Ärzte **49**, 1609 (1919). — GERARD, zit. n. ROMEIS. — HEDENIUS, P.: Acta med. scand. Suppl. **109** (1940). — HOERR, L.: Anat. record **66**, 149 (1936). — HOLTHUSEN, H.: Beitr. path. Anat. **49**, 595 (1910). — HUECK, V.: Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — KAUFMANN, C., u. E. LEHMANN: Virchows Arch. **261**, 23 (1926). — KAWAMURA, R.: Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911; Zur Morphologie und Physiologie der Cholesterinsteatose. Jena 1927. — KLEEBERG, J.: Virchows Arch. **244**, 37 (1923). — LENNERT, K., u. G. WEITZEL: Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chemie **288**, 266 (1951). — LISON, L.: Compt. rend. Soc. Biol. (Paris) **115**, 202 (1934); Histochimie animale. Paris 1936. — LUBARSCH, O.: Virchows Arch. **239**, 491 (1922). — MALLORY, F. B.: Pathological technique. Philadelphia und London 1944. — MONTAGNA, W., u. Ch. R. NOBACK: Amer. J. Anat. **81**, 39 (1947). — MONTAGNA, W.: Anat. record **104**, 243 (1949). — PELIZZI: Zit. — ZIVERI. — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948. — ROULET, E.: Methoden der pathol. Histologie, Wien 1948. — SCHULTZ, A.: Verh. dtsh. path. Ges. **20**, 120 (1925). — SMITH, Lorrain J.: J. of Path. a. Bact. **12**, 1 (1908). — WEITZEL, G., u. K. LENNERT: Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chemie **288**, 251 (1951). — ZIVERI, A.: Fol. neurobiol. **6**, 719 (1912).

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erhielten wir Kenntnis von den Untersuchungen CAINs an Nilblausulfat (A. J. CAIN; Biol. Rev. **29**, 91 [1950]). Auch CAIN kommt zu dem Ergebnis, daß NBS nicht spezifisch für ungesättigte Triglyceride sei, sondern, daß es allgemein flüssige oder schmierig-weiche Lipide färbt.

[Eingegangen am 8. November 1951]

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. A. LAUCHE)

Eine quantitative färberische histochemische Bestimmungs- methode der Nucleinsäuren im Gewebe

Von **Walter Sandritter**

Mit 2 Abbildungen im Text

Die Bedeutung der Nucleoproteide im Zellstoffwechsel ist durch die grundlegenden Arbeiten CASPERSSONS im letzten Jahrzehnt in den Mittelpunkt der biologischen Forschung gerückt. In diesen Untersuchungen sind die Nucleoproteide als Träger- und Aufbausubstanzen der wesentlichen Lebensbestandteile beim Zellwachstum, der Zellteilung und jeglicher Eiweißproduktion erkannt worden.

Diese Ergebnisse sind der von CASPERSSON entwickelten Ultraviolettlichtabsorptionsmethode zu danken, die auf der Absorption der Purin- und Pyrimidinderivate der Base der Nucleinsäure bei 2600 Å Wellenlänge beruht. Die exakte quantitative Methode erfordert einen großen apparativen Aufwand und erlaubt es nicht, die beiden Nucleinsäuren qualitativ zu trennen. Der Schwierigkeit der Methodik ist es zuzuschreiben, daß bisher nur einzelne Nachuntersuchungen erfolgten von deutscher Seite unseres Wissens überhaupt noch nicht.

Durch die CASPERSSONSchen Untersuchungen angeregt sind aber bisher eine große Zahl färberischer Nachweismethoden entwickelt und ausgebaut worden. Quantitative, färberische, photometrische Untersuchungen an mit Feulgen gefärbten Gewebsschnitten sind von STOWELL (1942) und später von POLLISTER und RIS mit der Methylgrün-Pyroninfärbung ausgeführt worden. Eine qualitative Beurteilung der beiden Nucleinsäuren ist BRACHET in Verbindung mit einem Fermenttest (Ribonuclease) gelungen.

Ein quantitativer Bindungsmechanismus zwischen Nucleinsäure und dem basischen Farbstoff Galloxyaninchromalaun konnte von EINARSON nachgewiesen werden. Das Farbstoffkation verbindet sich bei einem p_H von 1,64 salzartig mit der negativen Gruppe der Phosphorsäure der Nucleinsäure. Die ampholytischen Eiweißkörper des Gewebes bleiben dabei ungefärbt. Es handelt sich um eine progressive Färbung, die beide Nucleinsäuren in gleicher Weise erfaßt. Wie vergleichende Ultraviolettlicht- und färberische Untersuchungen von LAGERSTEDT gezeigt haben, besteht eine gute Übereinstimmung zwischen der Färbungsintensität, das heißt der Stärke der Basophilie und dem Grad der Lichtabsorption bei 2600 Å Wellenlänge.

Auf diesen Voraussetzungen, der qualitativen und quantitativen Bindung des Farbstoffes Galloxyaninchromalaun mit der Nucleinsäure und dem Fermenttest

BRACHET), basierend, haben wir eine quantitative lichtelektrische Methode des Nucleinsäurenachweises aufgebaut. Mit Hilfe einer Photozelle und eines Galvanometers wurde die Lichtdurchlässigkeit gefärbter Gewebsschnitte bestimmt und als Maß des relativen Nucleinsäuregehaltes gewertet. Die Verwendung eines galloccyaninchromalaungefärbten Schnittes, in dem beide Nucleinsäuren angefärbt werden und eines dem spezifischen Ferment Ribonuclease ausgesetzten Schnittes, in dem nur die Thymonuclease dargestellt wird, läßt eine getrennte Beurteilung der beiden Nucleinsäuren zu. Es lassen sich damit unter bestimmten Voraussetzungen nur untereinander vergleichbare Ergebnisse erzielen. Wir wandten die Methode zur vergleichenden Untersuchung des Nucleinsäuregehaltes verschiedener Tumoren und des entsprechenden Muttergewebes an¹⁾.

Methodische Voraussetzungen

1. Fixierung des Gewebes: Die Galloccyaninchromalaunfärbung kann zur quantitativen Nucleinsäurebestimmung nur an Alkohol oder Carnoy fixiertem Material angewandt werden. Das Carnoygemisch bedingt eine stärkere Farbbindung als die reine Alkoholfixierung. Die Fixierungsdauer richtet sich nach dem Volumen und der Dichte des vorliegenden Gewebsstückes, sollte aber nie über drei Stunden hinaus an drei bis vier mm dicken Stücken gebraucht werden. In 96%igem Alkohol fixierten wir an fünf mm dicken Stücken bis zu 20 Stunden. Die bei Anwendung alkoholischer Fixierungsmittel manchmal auftretenden Fixierungsränder dürfen als Artefakte nicht zu den Absorptionsmessungen herangezogen werden.

2. Einbettung: Die Gewebstücke brachten wir mit der bei uns üblichen Technik über Azeton (20 Minuten) und Nylol (15 Minuten) in Paraffin (24 Stunden bei 60 Grad). Andere Einbettungsmethoden (Methylbenzoat u. a.) dürften keine abweichenden Ergebnisse bedingen.

3. Herstellung und Behandlung der Schnitte: Bei der Aufarbeitung eines Materials zur vergleichenden Untersuchung empfiehlt es sich alle folgenden Arbeitsgänge einzeln vorzunehmen. Wir sammelten zum Beispiel Gewebestücke aus einem laufenden Material und fertigten zur Übersicht und Auswahl zuerst Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte an. Von den gewählten brauchbaren Paraffinblöcken wurden mit einem verläßlich arbeitendem Mikrotom drei Serienschnitte hergestellt und in ihrer Reihenfolge bezeichnet. Der erste Schnitt wurde Galloccyaninchromalaun gefärbt, der darauffolgende zuerst eine Stunde bei 60° der Ribonucleasebehandlung nach BRACHET ausgesetzt und dann gefärbt. Ein dritter Schnitt wurde entparaffiniert und ungefärbt in Balsam eingeschlossen. Die einzeitige Behandlung mit Ribonuclease ist besonders dann erforderlich, wenn nicht das standardisierte Ferment (KUNITZ) zur Verfügung steht. Man muß damit rechnen, daß sich bei Anwendung der selbsthergestellten Lösungen Unterschiede in der Wirkungsweise ergeben. Die Sicherheit einer gleichmäßigen Behandlung ist aber bei Anwendung der gleichen Fermentlösung für alle Gewebsschnitte gegeben.

¹⁾ Erscheint demnächst in Frankfurter Zeitschrift für Pathologie.

Herstellung der Ribonuclease nach BRACHET:

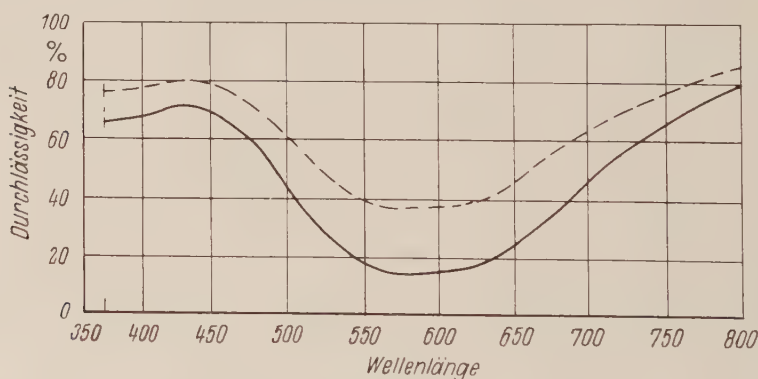
Eine bestimmte Menge frischen Ochsenpankreas²⁾ wird durch den Fleischwolf gedreht und mit dem ein- bis zweifachen Volumen $n/10$ Essigsäure versetzt. Die Aufschwemmung bleibt 24 Stunden bei 37° im Brutschrank und wird dann 10 Minuten gekocht. Ribonuclease ist im Gegensatz zu anderen Fermenten hitzebeständig. Die erkaltete Lösung wird filtriert und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Dann wird von neuem filtriert und während 20 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert. Das Dialysat wird zentrifugiert und die überstehende Lösung als Ferment benutzt. Der Wirkungsgrad verliert sich auch bei Aufbewahrung unter Toluol im Eisschrank sehr schnell. Auch das Einfrieren des Fermentes zerstört die Wirkung.

Bereitung der Farblösung nach EINARSON:

5 g reines Chromalaun werden in 100 ccm bidestilliertem Wasser gelöst, 0,15 Gramm Gallocyanin hinzugefügt und durch Schütteln gemischt. Dann wird langsam erwärmt und 5 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wird filtriert und auf 100 ccm mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Farblösung ist sofort gebrauchsfertig und hat einen pH von 1,64. Sie kann vier Wochen lang unverändert benutzt werden. Gefärbt wird 48 Stunden bei Zimmertemperatur und dann ohne die Färbungsintensität zu beeinflussen in der üblichen Weise differenziert.

Die Verwendung von drei aufeinander folgenden Schnitten erfordert eine genaue Festlegung der zur Messung vorgesehenen Gewebsteile im Schnitt. Wir fertigten eine Zeichnung der einzelnen Gewebspartien (z. B. Karzinomzellstränge) an, um in den anderen Schnitten jede Stelle sofort wieder auffinden zu können. Die einzelnen Stellen im Gewebe wurden numeriert und eine entsprechende Markierung auf dem Objektträger vorgenommen.

Optische Eigenschaften des Farbstoffes²⁾: Für die lichtoptischen Messungen war es Voraussetzung die Absorption des Farbstoffes bei verschiedenen Wellenlängen im sichtbaren Licht und in verschiedenen Farbstoffkonzentrationen zu untersuchen. Der fertige Farbstoff hat bei starker Verdünnung eine vorherrschend blaue Farbe mit einem gerade sichtbaren roten Schimmer. Im gefärbten Schnitt stellen sich die Nucleinsäuren blau dar.



Lichtdurchlässigkeitskurve von Gallocyaninchromalaun
 ————— Verdünnung 1:50 - - - - - Verdünnung 1:100

²⁾ Herrn Dr. SCHRAUB (Max-Planck-Inst. für Biophysik, Dir. Prof. Dr. B. RAJEWSKY) danken wir für die freundliche Unterstützung.

In Verdünnungen von 1 : 100 und 1 : 50 zeigt der Farbstoff im Wellenlängenbereich von 350 m μ bis 525 m μ , das heißt im Blauen, ebenso wie im Roten von 675 m μ bis 800 m μ eine hohe Durchlässigkeit bis zu 80% für 1 cm Schichtdicke, während im Zwischenbereich von 525 m μ bis 675 m μ eine geringe Durchlässigkeit vorhanden ist.

Leider orientiert uns diese Durchlässigkeitskurve nicht über die wahren Verhältnisse, wie sie sich im Schnitt darstellen. Im Gewebe tritt nur die blaue Komponente des Farbstoffes in Erscheinung, die salzartig mit der Nucleinsäure verbunden ist. In der Durchlässigkeitskurve des gebundenen Farbstoffes müßte demnach die Rotdurchlässigkeit wegfallen. Wir suchten nach einer Filterkombination, die uns im Bereich von 500 m μ bis 800 m μ das Licht weitgehend absorbiert. Wir verwendeten Schottfilter GG 7 in Kombination mit BG 17. Diese Filterkombination absorbiert sehr viel Licht, so daß man bei Benutzung eines 6L-Objektives nur sehr geringe meßbare Unterschiede zwischen dem unbehandelten und behandelten Schnitt erhält, besonders dann, wenn es sich um relativ nucleinsäurearmes Gewebe handelt und die Öffnung des Photozellenspalt klein gehalten wird. Bei nucleinsäurereichem Gewebe (z. B. Pankreas) sind die erhaltenen Werte bei geeigneter Öffnung des Photozellenspalt durchaus brauchbar. Man wird demnach bei nur geringen Meßunterschieden die Werte dadurch verbessern können, daß man den Photozellenspalt entsprechend größer wählt oder auf eine geringere Vergrößerung zurückgreift.

	Carcinomgewebe Durchlässigkeit %	Bindegewebe Durchlässigkeit %	Filter	Ver- größerung	Galvano- meter- einstellung
I	62,32	91,30	ohne Filter	Obj. 3	10 \times
	61,22	91,82	Gelbfilter		
	64,28	92,86	Blaufilter		
	60,61	90,38	Gelb- und Blaufilter		
	59,01	89,47	ohne Filter	Obj. 6 L	G
	60,0	89,83	Gelbfilter		
	59,03	90,57	Blaufilter		
	58,04	88,32	Gelb- und Blaufilter		
II	81,35	94,92	ohne Filter	Obj. 3	10 \times
	80,85	94,68	Gelbfilter		
	81,71	94,44	Blaufilter		
	77,92	94,12	Gelb- und Blaufilter		
	74,65	94,76	ohne Filter	Obj. 6 L	G
	73,66	94,17	Gelbfilter		
	74,76	94,56	Blaufilter		
	73,04	94,20	Gelb- und Blaufilter		

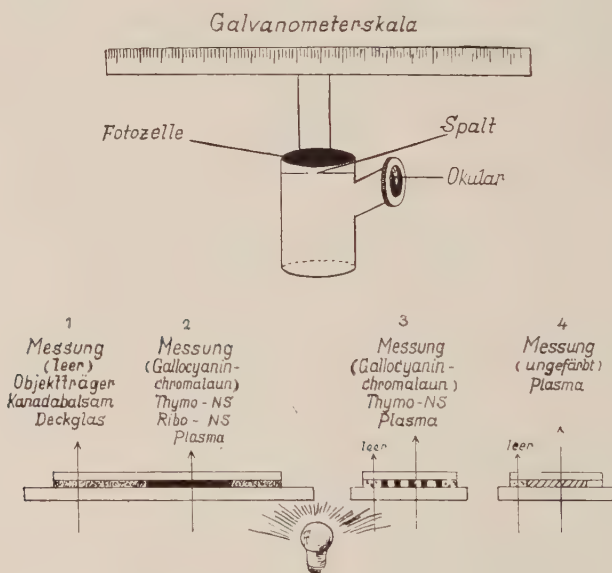
Lichtdurchlässigkeitswerte eines Carcinomzellstranges und des benachbarten Bindegewebes im heterochromatischen Licht und bei Vorschaltung verschiedener Filter. (Schnitt I und II Gallocyanchromalaun gefärbt, Schnitt II vorher Ribonuclease behandelt.)

In unseren Untersuchungen mußte der Photozellenspalt ziemlich klein gehalten werden ($22,8 : 51,3 \mu$) so daß bei Verwendung des 6L-Objektives in den Bereichen, die wir zu erfassen trachteten, kaum noch meßbare Unterschiede zu verzeichnen waren. Um unter diesen Bedingungen zu höheren Werten zu gelangen, müßte Photostromverstärkung oder ein Sekundärelektronenvervielfacher benutzt werden. Da uns dieser meßtechnische Aufwand aus finanziellen Gründen nicht möglich war versuchten wir die Fehlerbreite zu erfassen, die bei Verwendung heterochromatischen Lichtes beim Vergleich mit durch Filterung erzeugtem monochromatischem auftrat. Siehe Tabelle S. 33.

Die Tabelle zeigt die Messungsreihe eines Karzinomzellstranges und des benachbarten Bindegewebes bei mittlerer und starker Vergrößerung. Die Absorption ist bei Verwendung von Gelb- und Blaufilter am größten, das heißt, die Filter nehmen die unspezifische Lichtdurchlässigkeit weg. Die Unterschiede zu den Werten im heterochromatischen Licht sind aber so gering (maximal 2%), so daß man die Fehlerquelle bei hohen Differenzen vernachlässigen kann.

Meßmethode

Die Lichtschwächung an einer Stelle des Gewebes wird mit Hilfe einer Okularphotozelle und eines Galvanometers bestimmt³⁾. Die Okularphotozelle ist mit einem Spiegel, in dem das Blickfeld erscheint und einer verstellbaren Spaltöffnung versehen. Die Photozellenspaltöffnung und Vergrößerung muß in allen vergleichenden



Schematische Darstellung der Meßmethode.

Erste und zweite Messung am gallocyaninchromalaungefärbten Schnitt, dritte Messung am ribonucleasebehandelten Schnitt, vierte Messung ungefärbter Schnitt.

Untersuchungen konstant gehalten werden. Verschiedene Öffnungen und Vergrößerungen sind in ihren Meßwerten nicht miteinander vergleichbar.

Als Lichtquelle dient ein 6-Volt-Punktbirnenchen, das von einem Akkumulator betrieben wird. Die Spannung kann durch einen Widerstand konstant gehalten werden. Das Galvanometer muß auf den Nullpunkt eingerichtet werden.

Vor jeder Messung an einer Stelle im Gewebe wird die Lichtdurchlässigkeit außerhalb des Schnittes bestimmt (siehe Abb.). Dieser Wert I_o stellt die Lichtschwächung durch Objektträger, Kanadabalsam und Deckglas dar. Die I_o -Werte können durch Regelung des Widerstandes konstant gehalten werden. Die Absorption an der gefärbten Stelle des ersten Schnittes L_1 (Gallocyaninchromalaun gefärbt) wird berechnet durch Division der Leermessung I_{o1} durch den Lichtschwächungswert der gefärbten Stelle I_{t1} mal 100 ($L_1 = \frac{I_{o1}}{I_{t1}} \times 100$).

In gleicher Weise wird für den ribonucleasebehandelten Schnitt verfahren

$$(L_2 = \frac{I_{o2}}{I_{t2}} \times 100).$$

Die Messungen des dritten Schnittes stellen die Lichtabsorption durch das ungefärbte Gewebe an einer gekennzeichneten Stelle dar. Obwohl der letzte Wert auch bei verschiedensten Geweben ziemlich konstant ist (2 bis 3% Absorption)

muß er berücksichtigt werden ($L_3 = \frac{I_{o3}}{I_{t3}} \times 100$).

Der relative Nucleinsäuregehalt wird auf Grund der Meßwerte in folgender Weise errechnet: L_1 minus L_2 ergibt den Absorptionswert für Ribonucleinsäure; 100 minus L_2 den Absorptionswert für Thymonucleinsäure und das ungefärbte Gewebe; 100 minus L_2 minus L_3 den Absorptionswert für Thymonucleinsäure. Die Gesamtnucleinsäure errechnet sich aus $(100 \text{ minus } L_2 \text{ minus } L_3) + (L_1 \text{ minus } L_2)$.

Die Zahl der Messungen richtet sich nach der Art der vorliegenden Gewebe. Es empfiehlt sich die Anzahl so groß zu halten, daß eine statistische Sicherung der Meßwerte einer Gewebsart gegenüber einer anderen möglich ist. Wir führten mindestens 50 Messungen durch. Die Streuungsbereiche der Einzelwerte eines gemessenen Kollektivs wird durch den Variationskoeffizient V ausgedrückt (siehe unten).

Man erhält mit dieser Methode Relativwerte für die Nucleinsäuremenge im gemessenen Gewebavolumen, das durch die Fotozellenspaltgröße gegeben ist. In dieser Weise angewandt gleicht die Methode einer chemischen Bestimmung des Nucleinsäuregehaltes für eine gegebene Menge Substanz. Darüber hinaus kann man aber durch Bestimmung der mittleren Zellzahl pro Volumen Gewebe den relativen Nucleinsäuregehalt pro Zelle errechnen. Dies gilt nur unter der Voraussetzung, daß alle Zellen im Volumen den gleichen Nucleinsäuregehalt aufweisen.

Der Vorteil der morphologisch-histochemischen Methode besteht in der Möglichkeit, Bindegewebspartigen, Nekrosezonen und ähnliches auszusondern.

³⁾ Wir benutzten die Okularphotozelle und das Multiflexgalvanometer der Firma Dr. B. LANGE, Berlin.

Fehlermöglichkeiten

Es empfiehlt sich dünne weiße Objektträger einer Herstellungsserie zu verwenden. Innerhalb von 20 nicht mit Schnitten beschickten Objektträgern, die mit Kanadabalsam und Deckgläsern versehen waren und vorher der Farbe und Fermentlösung ausgesetzt wurden, ergaben sich nur geringe Lichtdurchlässigkeitsdifferenzen (maximal 0,2%).

Die Zuverlässigkeit des Mikrotoms kann durch Aufarbeitung eines homogenen Materials geprüft werden. Innerhalb von 20 Serienschnitten zwei verschiedener Gewebsblöcke eines Alkohol fixierten Ochsenpankreas ergaben sich Abweichungen bis zu 1% Lichtabsorption. Am gleichen Gewebstück erhält man bei Verschiebung der Schnittdicke um 1μ (von 4μ bis 10μ) Absorptionsdifferenzen von 3 bis 4% pro 1μ .

Die Verwendung von 2 bzw. 3 aufeinanderfolgenden Serienschnitten bedingt, daß in dem zweiten bzw. dritten Schnitt eine andere zellige Zusammensetzung des Gewebes vorliegt als im ersten. Die dadurch entstehenden Abweichungen werden durch eine größere Zahl von Messungen ausgeglichen, deren Mittelwerte allein brauchbar sind und statistisch gesichert sein müssen.

Die Zuverlässigkeit der Photozelle kontrolliert man durch Nachmessungen an verschiedenen Tagen. Die sogenannten „Ermüdungserscheinungen“ können bei einiger Erfahrung leicht erkannt werden.

Statistische Berechnung⁴⁾:

Der Variationskoeffizient V gibt Aufschluß über das relative Maß der Streuung. Pro Volumen gemessenen Gewebes (Photozellenspaltöffnung) errechnet sich der Variationskoeffizient aus $\frac{\sigma}{\bar{x}}$. \bar{x} stellt den Mittelwert der Einzelmessungen dar. σ^2 ist die Summe der Abweichungsquadrate dividiert durch die Anzahl der Messungen minus 1. $\sigma^2 = \frac{\sum (x_1 - \bar{x})^2}{n - 1}$

Zur statistischen Sicherung der Thymonucleinsäurewerte zweier Kollektiven bedienen wir uns des Vergleiches zweier Mittelwerte an Hand der Studentverteilung (t Tabelle). Die Formel lautet für die Werte pro Volumen gemessenen Gewebes:

$$1) \quad t = \frac{D}{\sigma_D} = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) (Q_1 + Q_2)}}$$

wobei D die Differenz der Mittelwerte, n die Anzahl der Messungen und Q die Summe der Abweichungsquadrate darstellt. Üblicherweise wird die Annahme, daß die beiden Stichproben aus einer einheitlichen Gesamtheit stammen, also die beiden Kollektivmittelwerte \bar{X}_1, \bar{X}_2 nur zufällig voneinander abweichen, abgelehnt, wenn die in entsprechenden Tabellen abzulesende Wahrscheinlichkeit für einen mindestens ebenso großen t -Wert wie den beobachteten etwa unterhalb von 0,0027 liegt.

Pro Zelle wird zur statistischen Sicherung der Thymonucleinsäurewerte sowohl in der Differenz der beiden Mittelwerte D wie bei σ_D die Zellzahl c berücksichtigt. Die Formel lautet:

$$2) \quad t = \left(\frac{\bar{x}_1}{c_1} - \frac{\bar{x}_2}{c_2} \right) \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) \cdot \left(\frac{Q_1}{c_1^2} + \frac{Q_2}{c_2^2} \right)}}$$

⁴⁾ Für die freundliche Unterstützung danken wir hier Frau Prof. M. P. GEPPERT (Kerkhoff-Inst., Bad Nauheim).

Die *Ribonucleinsäurewerte pro Volumen* errechnen sich aus den Mittelwertdifferenzen L_1 minus L_2 (siehe oben). Die Formel für t lautet hier:

$$3) \quad t = \frac{(x_1 - x_2) - (y_1 - y_2)}{\sqrt{\sigma_{Dx}^2 + \sigma_{Dy}^2}}$$

(Für σ_D^2 siehe Formel 1.)

wobei \bar{x}_1 und \bar{x}_2 den Werten L_1 und L_2 des ersten Kollektivs und \bar{y}_1 und \bar{y}_2 denen des zweiten Kollektivs gleich sind. D_x und D_y stellen die Mittelwertdifferenzen dar (L_1 minus L_2).

Für den Vergleich der *Ribonucleinsäure pro Zelle* zweier Kollektive wird wie oben die Zellzahl berücksichtigt. Die Formel lautet:

$$4) \quad t = \left(\frac{\bar{x}_1}{c_1} - \frac{\bar{x}_2}{c_1} \right) - \left(\frac{\bar{y}_1}{c_2} - \frac{\bar{y}_2}{c_2} \right) \sqrt{\sigma_{Dx}^2 + \sigma_{Dy}^2}$$

wobei sich σ_D^2 aus Formel 2 ergibt.

Zusammenfassung

Es werden die Voraussetzungen und die Methodik einer photoelektrischen färbereichen quantitativen Bestimmung der Nucleinsäuren im Gewebsschnitt beschrieben. Beide Typen der Nucleinsäure (Ribo- und Thymonucleinsäure) können erfaßt werden.

Schrifttum

- 1) BRACHET, Arch. Biol. **53**, 207 (1942).
- 2) CASPERSSON, Skand. Arch. f. Physiologie Suppl. 8 zum 73. Bd.
- 3) EINARSON, Acta path. Scand. **28**, 82 (1951).
- 4) KUNITZ, J. Gen. Physiol. **24**, 15 (1940).
- 5) LAGERSTEDT, Acta Anat. Suppl. **9** (1949).
- 6) POLLISTER und RIS, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. XII, 147 (1947).
- 7) STOWELL, J. Nat. Cancer Inst. **3**, 111 (1942).

[Eingegangen am 28. November 1951]

Die Spezifität histologischer Silberimprägnationen

Von Walther Lipp

Fast alle Zell- und Faserstrukturen menschlicher oder tierischer Gewebe können elektiv mit Silber schwarz imprägniert werden. Gemeinhin wird in der Histologie zwischen Vorversilberung und Nachversilberung unterschieden, wobei sich die Vorsilbe auf den Zeitpunkt der Gewebsfixierung bezieht. So wird bei der Vorversilberung frisches Gewebsmaterial vor der Fixierung unter verschiedenen Bedingungen entsprechend dem beabsichtigten Erfolg in Silbersalzlösungen eingelegt; bei der Nachversilberung eben erst nach einer geeigneten Gewebsfixierung.

Vom Gesichtspunkt des zur Imprägnation benötigten Verfahrens aus wird weiters bei den sich schwärzenden Zell- und Gewebeelementen zwischen argentaffinen und argyrophilen Strukturen unterschieden. Als argentaffine Strukturen werden solche bezeichnet, welche sich in ammoniakalischen Silberlösungen elektiv imprägnieren, ohne daß der Zusatz eines weiteren Reduktionsmittels nötig wäre. Als argyrophil werden dagegen jene zahlreichen Elemente bezeichnet, welche sich mit den üblichen Versilberungsmethoden von BIELSCHOWSKY, CAJAL, HORTEGA, BODIAN usw. durch Zusatz eines Reduktionsmittels schwarz imprägnieren lassen.

Der Grad und die Art der Spezifität der Silberimprägnationen ist je nach dem angewendeten Verfahren verschieden. Die Vorversilberung — ihr Anwendungsgebiet ist begrenzt — stellt gewisse Zellgrenzen, zum Beispiel zwischen Endothelzellen oder Mesenteriumdeckzellen, dann die RANVIERSchen Kreuze der markreichen Nervenfasern, aber auch Ascorbinsäure und andere reduzierende Substanzen in den Zellen dar. Chemische Reaktionen spielen dabei eine führende Rolle. So werden Chlorionen für die Versilberung der Zellgrenzen¹⁾ und der RANVIERSchen Kreuze²⁾ verantwortlich gemacht. Man stellt sich vor, daß im Silbernitratbad in diesen Strukturen lichtempfindliches Silberchlorid entsteht. Bei der nachfolgenden Belichtung der Präparate sollen sich dann Photochloridkeime bilden, welche durch Anlagerung metallischen Silbers sichtbar werden.

Eine weitestgehend spezifische Reaktion stellt der Nachweis von Vitamin C dar³⁾. Bei diesem Verfahren werden frische Gewebsschnitte im Dunkeln in angesäuerte Silbernitratlösung eingebracht. Unter diesen Bedingungen vermag nur die

¹⁾ JALOWY, B., und B. CHRZANOWSKI, Z. wiss. Mikr. **56** (334—344), 1939.

²⁾ CORRENS, A. E., Z. mikr.-anat. Forsch. **45** (376—392), 1939.

³⁾ TONUTTI, L., Z. mikr.-anat. Forsch. **48** (1—53), 1940.

l-Askorbinsäure das Silbernitrat zu metallischem Silber zu reduzieren. Es entstehen dadurch schwarze Granula in Zellbezirken, die besonders reich an Vitamin C sind. Naturgemäß kann mit diesem Vorversilberungsverfahren nur der Teil der Ascorbinsäure erfaßt werden, der in den Zellen in reduzierter Form und reaktionsfähig vorliegt. Der Schwellenwert dieses Verfahrens ist also relativ hoch.

Der Nachweis argentaffiner Substanzen kann als Vor- oder Nachversilberung ausgeführt werden. Unter den Begriff „argentaffine Substanz“ fällt eine große Gruppe chemischer Körper, welche alle ammoniakalische Silberlösung von sich aus in der Kälte zu reduzieren vermögen und sich mit dem reduzierten Silber schwärzen. Vor allem sind dies Polyphenole in Ortho- und Parastellung, Polyamine, Amino-phenole u. a. m.⁴⁾. Eine weitgehende Spezifität besitzt also diese Reaktion nicht.

Eine besondere Stellung unter diesen reduzierenden, argentaffinen Körpern nimmt die Körnchensubstanz der basalgranulierten Zellen im Epithel des Verdauungstraktes ein. Diese Granula vermögen sich erst nach Fixierung des Gewebes mit Formol in ammoniakalischer Silberlösung zu schwärzen, sind also nur der Nachversilberung zugänglich. Man nimmt an, daß in den Granula der basalgekörnten Zellen ein Dioxybenzol (Resorzin) vorliegt. Dieses wird bei der Fixierung mit Formol zu einem chemischen Körper kondensiert, welcher erst die ammoniakalische Silberlösung in der Kälte zu reduzieren vermag.

Bei allen erwähnten Verfahren der Vorversilberung und der Darstellung argentaffiner Substanzen handelt es sich demnach um Versilberungsmethoden, bei denen rein chemische Reaktionen im Vordergrund stehen. Sie sind je nach der Art der nachzuweisenden Substanz und der Zusammensetzung der verwendeten Silberlösung für eben diese Substanz chemisch mehr oder weniger spezifische Nachweisverfahren.

Ganz anders verhalten sich die Versilberungsmethoden zur Imprägnation argyrophiler Strukturen. Zu dem Begriff „argyrophile Struktur“ zählen vor allem Faserelemente wie Gitterfasern und Nervenfasern, aber auch verschiedene Zellgranulationen, z. B. die Körnchen der A-Zellen in den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas. Alle diese Zell- und Gewebelemente können mit einer Imprägnationsmethode jeweils durch relativ geringfügig erscheinende Änderungen der Anwendungsweise, etwa durch Variation der Verweildauer in einem Reagens dargestellt werden. Man hat gedacht, daß auch bei diesem Versilberungsverfahren chemische Reaktionen eine große Rolle spielen. Es könnten etwa argyrophile Strukturen eine besondere chemische Affinität zu Silber haben oder mit einer „argyrophilen Substanz“ durchtränkt sein. Das scheint aber nicht der Fall zu sein. Schon auf Grund der verschiedenen Funktionen argyrophiler Strukturen kann man kaum annehmen, daß alle aus den gleichen chemischen Bausteinen mit infolgedessen auch gleichen reaktionsfähigen Gruppen bestehen. In ähnlicher Weise spricht die Launenhaftigkeit der Imprägnationsmethoden, welche auch bei scheinbar gleicher Anwendung bald diese, bald jene Struktur schwarz imprägnieren, gegen die Annahme einer besonderen chemischen Spezifität. Eine physiko-chemische

⁴⁾ LISON, L., *Histochimie animale*, Paris 1936.

mische Analyse der vielfach verwendeten Versilberungsmethode nach BIELSCHOWSKY-GROS⁵⁾ hat dagegen ergeben, daß hauptsächlich die submikroskopische Struktur der darzustellenden Zell- und Gewebelemente das Ergebnis der Versilberungsprozedur bedingt. Es ist auffallend, daß die meisten biologischen Fasern nach dem gleichen Strukturprinzip gebaut zu sein scheinen. Die mikroskopisch sichtbaren Fibrillen setzen sich aus einer wechselnden Anzahl submikroskopischer Mikrofibrillen zusammen, welche ihrerseits aus einzelnen Mizellarsträngen bestehen. Die gelegentlich miteinander anastomosierenden Mikrofibrillen werden durch Intermikrofibrillarräume voneinander getrennt. Wechselnd je nach der Faserart ist außer den elektronenmikroskopischen Faserperioden die Dicke der Mikrofibrillen und die Weite der Intermikrofibrillarspalten. Der Versilberungsprozeß, welcher sich hauptsächlich in diesen Räumen abspielt, wird aber maßgeblich von der Weite der Intermikrofibrillarspalten beeinflusst. Die Größe der entstehenden Silberteilehen und damit die Art der Imprägnationsfarbe der Strukturen scheint in direktem Zusammenhang mit der submikroskopischen Porengröße (Dichte) der Gewebelemente zu stehen. Dies kann in einfachen Modellversuchen leicht nachgewiesen werden. Die hier dargestellte Ansicht steht in guter Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an nach GOMORI versilberten kollagenen Fibrillen, welche N. DETTMER, I. NECKEL u. H. RUSKA (Z. wiss. Mikr., **60**, 290—297, 1951) und W. SCHWARZ u. N. DETTMER (Demonstration, 50. Versammlung d. Anat. Gesellschaft, Marburg, 15.—18. IV. 1952) in letzter Zeit veröffentlicht haben. Bei Quellung der Fibrillen nimmt die Größe der zwischen den Mikrofibrillen im Inneren der kollagenen Fibrillen liegenden Silberpartikel bis zu einem gewissen Maß zu. Überschreitet die Vergrößerung der Intermikrofibrillarräume eine bestimmte Grenze, wird die Versilberung unregelmäßig, bis schließlich nur noch wenige, große und unregelmäßig verteilte Silberkörner in den maximal gequollenen kollagenen Fibrillen gefunden werden. Im Gegensatz dazu scheint sich die Versilberung der elektronenoptisch sichtbaren argyrophilen Fibrillen an deren Oberfläche abzuspielen (E. v. HERRATH u. N. DETTMER, Z. wiss. Mikr., **60**, 282—289, 1951). Dies könnte darauf hindeuten, daß die argyrophilen Fibrillen nicht aus feineren Mikrofibrillen zusammengesetzt sind, bzw., daß die Intermikrofibrillarräume zwischen diesen zu enge sind, um der Versilberung zugänglich zu sein. Die Silberpartikel scheinen daher in der Kittsubstanz abgelagert zu werden, welche die elektronenmikroskopisch sichtbaren argyrophilen Fibrillen zur lichtmikroskopisch erkennbaren argyrophilen Faser vereinigt. Die Durchmesser der Silberteilehen an argyrophilen Fibrillen entspricht ungefähr dem Diameter der Silberpartikel in mäßig gequollenen kollagenen Fibrillen.

Im einzelnen sind die Vorgänge bei der Imprägnation nach BIELSCHOWSKY-GROS verwickelt und nicht vollständig geklärt. Nach Fixierung in Formol werden die Gewebsblöcke einer mehrstündigen Wässerung in fließendem und destilliertem Wasser unterzogen. Diese Wässerung wirkt wie eine Dialyse. Sie entfernt alle frei beweglichen und eventuell störenden Ionen gemeinsam mit Eiweiß- und

⁵⁾ LIPP, W., Protoplasma **40** (275—297), 1951.

Lipoidspaltprodukten, die bei der Fixierung entstanden sind. Überdies wirkt sie quellend. Nun werden Gefrierschnitte hergestellt und in 20%ige Silbernitratlösung eingelegt. Hierbei kommt es zur Bildung von meist noch unsichtbaren „Silberkeimen“. In der Silbernitratlösung sind Silberionen, Silberhydroxyd und — besonders in älteren Lösungen — auch kolloidales metallisches Silber vorhanden. Das Entstehen der Silberkeime dürfte man sich so vorzustellen haben, daß zunächst die in der Lösung vorhandenen Silberionen in wechselndem Ausmaß von den Eiweißstrukturen je nach deren isoelektrischem Punkt und dem pH der Lösung elektrostatisch adsorbiert werden. Die adsorbierten Silberionen gehen dann mit den Eiweißarten der Gewebe chemische Bindungen ein. An diese Silberalbuminate können sich noch alternierend Silberhydroxyd und kolloidales metallisches Silber in wechselndem Ausmaß anlagern. Diese Silbersalzkomplexe werden bei ihrem Entstehen durch die Reduktionskraft des Gewebes, wahrscheinlich aber noch in viel größerem Ausmaß durch freiwerdendes Formol, teilweise reduziert. Dieses wurde während der Fixierung des Gewebes locker an die histologischen Strukturen gebunden und wird von ihnen zum Teil bei der Wässerung, aber auch noch in der Silbernitratlösung in wechselnder Menge wieder abgegeben.

Silberkeime entstehen in allen Geweben; das Ausmaß der Keimbildung ist je nach der Gewebeart verschieden. Für die Verteilung der Keime könnten chemisch reaktionsfähige Gruppen der histologischen Substrate eine Rolle spielen, doch kann auch bei der Keimentstehung ein gewisser Einfluß der submikroskopischen Architektur der Gewebselemente nachgewiesen werden. Es scheint aber nicht so sehr auf die Zahl der primär gebildeten Silberkeime anzukommen. Wichtiger für die vollkommene Schwarzimprägnation einer Struktur dürfte es sein, daß ihr submikroskopischer Aufbau einerseits das Haften der Keime ermöglicht und andererseits auch ihre schnelle Vergrößerung zuläßt. Die weiteren Manipulationen der Silberimprägnation haben das Ziel, die meist noch unsichtbaren Silberkeime auf eine farbgebende Größe zu bringen. Es ist dies ein Vorgang, der einigermaßen dem Entwickeln einer belichteten Photoplatte entspricht. Verschiedene Flüssigkeiten mit differenten Oberflächenspannungen werden dazu verwendet. In den Gewebsschnitten kommt es daher zu heftigen Diffusionsströmungen, denen die Silberkeime widerstehen müssen und denen solche Keime, die nicht genügend haften, leicht zum Opfer fallen können.

Nach der Bekeimung in der Silbernitratlösung kommen die Schnitte in Formol. Bei diesem Vorgang werden die als Keime bezeichneten Silbersalzkomplexe weiter reduziert und gleichzeitig durch Anlagerung neuer Silberionen vergrößert. Die Gewebsschnitte werden ohne Abspülen aus der Silbernitratlösung in Formol übertragen; sie nehmen daher eine gewisse Menge Silbernitrat mit. Außerdem werden Silberionen in den Hydratationshüllen der Strukturen festgehalten. Diese Ionen stehen zu den Gewebselementen schon in engerer Beziehung. Sie können sich an ihnen leicht verschieben und dürften bei der Keimvergrößerung während der Formolreduktion eine besondere Rolle spielen.

Nach der Formoleinwirkung werden die Silberkeime in ammoniakalischer Silberlösung weiter „entwickelt“, also auf die endgültige Größe gebracht. Die

Schnitte sind, da sie von einer Lösung direkt in die andere übertragen werden, mit Formol durchtränkt. Dieses bewirkt in der ammoniakalischen Silberlösung in und um den Schnitt die Entstehung von feinverteiltem naszierendem Silber, welches sich an die in den Strukturen vorhandenen Silberkeime anlegt. Bei diesem Imprägnationsschritt ist die submikroskopische Struktur der Gewebelemente von besonders großem Interesse. Sie bedingt wesentlich die Schnelligkeit mit der die Keimvergrößerung vor sich geht.

Die mikroskopische Imprägnationsfarbe einer histologischen Struktur hängt von der Teilchengröße der in ihr enthaltenen Silberpartikel ab. Von einem bestimmten Durchmesser an ergeben kleine Teilchen gelbe Farbtönungen. Mit dem Größerwerden der Silberpartikel werden die Farben immer dunkler, bis schließlich die größten Teilchen rein schwarze Imprägnationsfarben ergeben. Unterbricht man den Versilberungsprozeß solange es sich noch um reine Imprägnation — also „Durchtränkung“ der Gewebelemente mit reduziertem Silber — handelt, so zeigen die histologischen Strukturen Imprägnationsfarben, wie sie ihr submikroskopischer Aufbau im wesentlichen bedingt und zuläßt. Meist wird aber der Entwicklungsprozeß der Silberkeime noch weiter fortgeführt. Es kommt zur Inkrustation, also zur „Auflagerung“ weiterer Silberteilchen auf einzelne Gewebelemente. Davon werden gerade diejenigen histologischen Strukturen betroffen sein, deren submikroskopische Poren wegen ihren besonderen Eigenschaften vor allen anderen mit reduziertem Silber aufgefüllt sind. An der mikroskopischen Oberfläche leicht zugänglicher histologischer Strukturen können die Silberpartikel ungehemmt wachsen. Diese Gewebelemente werden besonders stark inkrustiert und merklich durch die Silberauflage verdickt. Unterbricht man den Versilberungsprozeß nicht im geeigneten Augenblick, wird schließlich der ganze Gewebsschnitt einheitlich schwarz inkrustiert.

Aus der Analyse des Versilberungsvorganges an Hand der BIELSCHOWSKY-GROS-Methode ergibt sich zwanglos die Definition der Spezifität von Imprägnationsverfahren zur Darstellung argyrophiler Strukturen. Während beim Nachweis der Argentaffinität im wesentlichen chemische Substanzen auf Grund chemischer Reaktionen die Imprägnation bewirken, hängt Argyrophilie zu einem großen Teil von der submikroskopischen Struktur ab. Neurofibrillen und Bindegewebsfasern werden nicht wegen ihrer spezifisch chemischen Eigenschaften in verschiedenen Farben dargestellt, sondern weil sie Faserproteine mit ungleich weiten und verschiedenen zugänglichen Interfibrillarraumsystemen sind. Ebenso dürften die unterschiedlichen Imprägnationsfarben von post- und praeganglionären Neuriten eher auf Verschiedenheiten in ihrem submikroskopischen Aufbau als auf Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung zurückzuführen sein. Wir wissen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen⁶⁾, daß die Dimensionen der Intermikrofibrillarräume einzelner Nervenfasernarten innerhalb recht weiter Grenzen schwanken können.

⁶⁾ de ROBERTIS, E. D. P., W. W. NOWINSKI and F. A. SAEZ, General Cytology, Philadelphia 1948.

Auch beim Anstellen histochemischer Reaktionen mit Silbersalzen hat man mit dem Einfluß der Gewebeskolloide zu rechnen. Ein positiver Ausfall zeigt immer nur an, daß eine bestimmte Substanz oder Substanzgruppe über dem Schwellenwert vorhanden ist. Es ist aber unmöglich, aus der entstandenen Imprägnationsfarbe unmittelbar auf die Menge des entstandenen reduzierten Silbers zu schließen. Die Farbtönung hängt nur von der Teilchengröße der Silberpartikel ab. Es ist theoretisch durchaus denkbar, daß eine gelb imprägnierte histologische Struktur mehr Silber enthält, als eine z. B. braun versilberte. Das Silber ist in der gelb imprägnierten Struktur nur in feineren Partikeln vorhanden⁷⁾.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß den Silberimprägnationen eine gewisse Spezifität zukommt. Der Ausfall der Versilberung eines Zell- oder Gewebselementes kann von seinen reaktionsfähigen chemischen Gruppen und von seinem submikroskopischen Aufbau abhängen. Je nach der Art des verwendeten Imprägnationsverfahrens spielen entweder rein chemische oder ultrastrukturelle Faktoren die führende Rolle.

⁷⁾ ZEIGER, K., Physiko-chemische Grundlagen der histologischen Methodik, Dresden u. Leipzig 1938.

[Eingegangen am 24. November 1951]

Kleine Original-Mitteilungen

Berninger, Hans, Eine verbesserte Methode der Einbettung anatomischer Präparate mit Celodal. (Aus dem Anatomischen Institut der Universität Heidelberg, Direktor: Prof. Dr. H. HOEPKE.) — Eingegangen am 30. III. 1951.

Vor etwa 14 Jahren hat die I. G.-Farbenindustrie ein erhärtendes Kunstharz auf der Formaldehyd-Harnstoff-Grundlage entwickelt (1). Diese, unter dem Namen Celodal in Handel gekommene Masse, ist ein zähflüssiges ankondensiertes Produkt, das auf Zusatz von beliebigen sauer reagierenden Stoffen, „Härter“, zu einer festen, glasklaren Masse erstarrt. Die Verfestigung geht bei Zimmertemperatur ohne Erwärmung einher; die Erstarrungszeit ist abhängig vom Säuregrad des Härters und der Temperatur der Umgebung. Sie kann durch Variation dieser beiden Größen in weitem Rahmen den vorliegenden Bedürfnissen angepaßt werden. Für anatomische Präparate verwendet man eine 10%ige Oxalsäurelösung, von der man 3 ccm auf je 100 g Celodal zur Härtung gibt. Das einmal erstarrte Celodal ist in Wasser und verdünnten Säuren völlig unlöslich; es quillt etwas in starken Alkalien und wird nur von konzentrierten Mineralsäuren zerstört. Nach SCHEUERMANN und TAUBÖCK ((1), Seite 323) scheint das Celodal eine starke Absorption für UV-Licht zu besitzen. Während einer Bestrahlung von 900 Min. UV-Quarzlicht konnte keine Ausbleichung von Blütenfarbstoffen beobachtet werden; auch starke Sonnenbestrahlung konnte keinerlei Veränderungen hervorrufen. Diese Eigenschaften machen das Celodal zu einem hervorragenden Einschuß-Mittel, da die darin eingebetteten Objekte vor allen mechanischen, chemischen und ausbleichenden Schäden geschützt sind. Insbesondere können auch bei feinen Präparaten keine Abrisse infolge der Flüssigkeitsströmung eintreten, wie dies bei den bisherigen Methoden nicht selten der Fall war. Auch die empfindlichsten Korrosionspräparate können — in Celodal eingebettet — unbedenklich demonstriert und herumgereicht werden. Sollte wirklich einmal eine Zerstörung des äußeren Glasgefäßes eintreten, so schützt die Celodalhülle das Objekt, und der von den Glassplittern befreite Block kann ohne weiteres wieder frisch in ein neues, etwas größeres Glas eingebettet werden. Die Größe spielt bei der Einbettung keine Rolle.

Ein Nachteil des Celodals lag in seiner sirupösen Konsistenz. Bei dem notwendigen starken Einrühren des Härters schließt die Masse eine große Zahl Luftblasen ein, die während der Erstarrungszeit in dem zähen Harz nicht mehr an die Oberfläche wandern können. Desgleichen bleiben bei der Einbettung an rauen Stellen gerne Luftblasen zurück, die recht störend sind. In der Originalvorschrift wird diese Schwierigkeit dadurch umgangen, daß man die mit dem Härter versetzte Masse vor der Einbettung im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe entlüftet, und auch gegebenenfalls die Einbettung im Vakuum vornimmt. Wenn auch dieses Verfahren bei kleineren Objekten leicht durchgeführt werden kann, so können doch bei größeren Präparaten infolge der großen Räume, die evakuiert werden müssen, besonders dem in der Vakuumtechnik nicht Bewanderten Schwierigkeiten entstehen. Es gelang nun, eine Methode zu finden, bei der jegliche Anwendung eines Vakuums ausgeschaltet werden konnte.

Die Arbeiten wurden im Jahre 1948 im hiesigen anatomischen Institut begonnen. Da nach dem Kriege die Celodal-Produktion noch nicht angelaufen war, mußte

auf ältere noch vorhandene Vorräte zurückgegriffen werden. So wurde zu einem Teil der Versuche eine 7 Jahre alte Probe verwandt, die während der ganzen Zeit kühl und trocken gelagert war. Die Kondensationsfähigkeit dieser Probe war ungemindert vorhanden, jedoch war zur Erreichung eines bestimmten Härtegrades eine höhere Säurekonzentration als bei frischen Proben erforderlich. Anscheinend wurde dieses Phänomen durch Alkali-Aufnahme aus der Aufbewahrungsflasche bedingt. Eine weitere Probe stand unbekannter Zeit, jedoch mindestens 4 Jahre, in einem normal benutzten Zimmer. Diese Probe zeigte gegenüber frischen Proben eine raschere Erstarrung bei gleicher Säurekonzentration und Temperatur. Anscheinend war hier der Kondensationsvorgang bei der höheren Temperatur langsam weitergeschritten, doch war auch diese Probe noch in vollem Umfange verwendbar. Beide Proben zeigten gegenüber frischem Celodal eine erhöhte Viskosität, eine vollständige Entlüftung im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe war aber nicht mehr möglich.

Wie oben ausgeführt, liegt das Problem der Entlüftung des Celodals in der hohen Viskosität der Masse gegenüber der Erstarrungszeit. Wenn auch kleinere Luftblasen — wie bei Kanadabalsam — allmählich verschwinden, so können doch größere Blasen in der Zeit bis zur Erstarrung nicht mehr bis zur Oberfläche gelangen. Eine Verminderung der Viskosität des Celodals wurde durch Verdünnen der Masse angestrebt. In Anbetracht der chemischen Natur des Kunststoffes und der Tatsache, daß beim Versetzen mit Wasser Trübungen der festen Masse auftreten können, wurde als Verdünnungsflüssigkeit 30%iges Formol (= 30% Formaldehyd in Wasser) verwandt. In hohen, schmalen Reagenzgläsern wurden 4 Verdünnungsproben folgender Zusammensetzung angesetzt. Das Celodal wurde versetzt mit:

- | | | | | | |
|----|-----|--------|-----|------|---------|
| 1. | 10% | Formol | und | 3% | Härter. |
| 2. | 18% | „ | „ | 3% | „ |
| 3. | 21% | „ | „ | 2% | „ |
| 4. | 29% | „ | „ | 2,5% | „ |

Als Härter wurde 10%ige Oxalsäurelösung verwandt. Die Proben enthielten alle nach Einrühren des Härters eine große Anzahl Luftblasen. Alle Proben wurden ohne Evakuierung bei Zimmertemperatur senkrecht aufgestellt. Bei dieser Versuchsreihe wurden folgende Ergebnisse beobachtet:

Sämtliche Proben waren nach 10 Tagen vollkommen erhärtet; eine Trübung durch die Verdünnung mit Formol war nicht eingetreten. Probe 4 war vollkommen frei von Luftblasen, während Probe 3 noch eine geringe, nicht störende Anzahl kleiner Luftbläschen enthielt. Proben 1 und 2 wiesen noch in zahlreicherem Maße Blasen auf. Probe 3 und 4 zeigten eine so große Verminderung der Viskosität, daß auch beim Einschluß schwieriger, zerklüfteter Präparate kein Festhalten von Blasen an der Oberfläche des Präparates zu befürchten war. Durch die Verdünnung des Celodals mit 30%iger Formaldehydlösung war somit ein Weg gewiesen, die örtl. schwierige Vakuumtechnik zu umgehen, ohne die wertvollen Eigenschaften dieses Konservierungsmittels zu beeinträchtigen. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe wurde nun sofort praktisch verwertet.

Für die nun vorgenommenen Versuche wurden zuerst ältere Präparate der bisherigen Sammlung verwandt. Diese Präparate lagen schon längere Zeit in Alkohol und sollten nun in das mit Formol verdünnte Celodal eingebettet werden. Während der langen Lagerzeit hatte der Alkohol die Gewebe ausgelaugt, und sich stark verfärbt. Eine Einbettung in Celodal gelang erst nach ausgiebiger Wässerung dieser Objekte, da der mit den Gewebsstoffen beladene Alkohol die Erstarrung des Celodals verhinderte. Nach mindestens 48stündiger Wässerung in kaltem, fließendem Wasser wurden die Objekte in eine Mischung von Celodal und 30%igem Formol im Verhältnis 1 : 1 gelegt. Da das Celodal ein relativ hohes spez. Gewicht (1,28) besitzt, sinken manche Objekte auch in dieser verdünnten Lösung nicht

unter; sie werden dann beschwert und bleiben so lange in der Lösung liegen, bis sie nicht mehr zur Oberfläche auftauchen. Jedenfalls müssen alle Objekte so lange in dieser Lösung verbleiben, bis sie völlig durchtränkt sind, die Durchtränkungszeit ist abhängig von der Größe und Konsistenz der Präparate. Hiernach werden die Objekte in eine weitere Mischung Celodal/Formol im Verhältnis 3 : 1 gebracht. Auch hier verbleiben die Objekte bis zur vollständigen Durchtränkung, die infolge der größeren Dichte längere Zeit erfordert. An dieses zweite Bad, das ebenso wie das erste, keinen Zusatz von Oxalsäure erhielt, schließt sich nun die eigentliche Einbettung an. Zur Einbettung wird eine Celodallösung verwandt, die 25 % Formol und 3 % einer 10 % igen Oxalsäurelösung als Härter enthält. Die mit 25 % Formol versetzte Celodallösung ist ohne Härterzusatz längere Zeit beständig, so daß man sich davon einen größeren Vorrat ansetzen kann. Hierzu übergießt man eine abgewogene Menge Celodal mit der entsprechenden Menge Formol und läßt über Nacht stehen. Am nächsten Tag verrührt man nun die Mischung so lange, bis sie völlig homogen geworden ist, was man am Verschwinden der Schlieren beim Umrühren erkennt. Zur Einbettung gießt man sich nun die gewünschte Menge ab und versetzt sie mit dem Härter. Es ist dabei sehr wichtig, daß der Härter gut in die Mischung eingerührt wird. Die dabei auftretenden Luftblasen sind völlig belanglos, sie verschwinden nach wenigen Stunden. Viele Objekte werden nun auch in der verdünnten Celodalmischung nicht mehr völlig untersinken, da sie ein kleineres spez. Gewicht als diese haben. Auch kommt es bei der längeren Erstarrungszeit vor, daß sich die Objekte aus ihrer Orientierung begeben und eine neue Lage einnehmen. Dieses Problem wurde auf folgende Weise gelöst: Ein Glasstab wurde so gebogen, daß er auf seinen zu Spitzen ausgezogenen Enden das Objekt aufgespießt im Präparatenglas tragen konnte und selbst auf dem Boden des Glases fest ruhte. Mit einer kleinen Menge unverdünnten (!) Celodals, das mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure zur Härtung versetzt war, wurde der Glasstab auf dem Boden des Präparatenglases festgekittet. Am nächsten Tag, nach Erstarrung des Celodalkitts, kann das Objekt mit leichtem Druck auf die Spitzen des Glasstabes aufgespießt werden, woran sich sofort das Eingießen der Einbettungsmasse schließt. Das am Boden des Glases festgekittete Glasstäbchen verhindert nun völlig ein Hochschwimmen oder eine Desorientierung des Objektes. Man gießt das Präparatenglas nur so voll, daß $\frac{1}{2}$ cm Rand oben frei bleibt und deckt mit einer Glasplatte ab. Ist die Masse erstarrt, so wird das Glas voll mit Celodal angefüllt und die Deckplatte zur Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Erst wenn diese zweite Füllung erstarrt ist, wird evtl. überschüssiges Celodal mechanisch entfernt. In seltenen Fällen, insbesondere bei großen Objekten, die nicht genügend gewässert oder mit Celodal durchtränkt sind, kann es vorkommen, daß die Erstarrung des verdünnten Celodals ausbleibt. Solche Objekte werden dann einfach nach längerer Zeit (nicht vor 1 Jahr) nach Abgießen des nicht erstarrten Celodals mit einer frischen Mischung, der man evtl. etwas mehr Härter zusetzt, wieder in der gleichen Weise eingebettet. Das abgegossene Celodal kann zur vorbereitenden Durchtränkung als 2. Bad verwandt werden. Bei allen diesen Arbeiten ist peinlichste Sauberkeit unerläßlich, wenn man Mißerfolge vermeiden will. Die eingebetteten Präparate sind haltbar, es treten weder Risse durch Schrumpfung noch Trübungen des Einschlusßmittels auf. Es ist jedoch sehr empfehlenswert, die Präparate vor zu starker Erwärmung und vor raschem, starkem Temperaturwechsel zu schützen. Infolge des hohen Brechungsexponenten zeigte das Celodal eine starke Aufhellungswirkung; dünnere Objekte wurden durchscheinend; auch dieses nicht immer erwünschte Phänomen wird durch die Verdünnung mit Formol gemildert.

Bei sehr schwierigen Präparaten mit stark zerklüfteter Oberfläche kann es u. U. doch einmal vorkommen, daß eine Luftblase sich bei der Einbettung so verfängt, daß sie nicht mehr zur Oberfläche gelangen kann. Man kann dann in diesem Falle das eingebettete Präparat unter das Vakuum einer Wasserstrahl-

pumpe bringen, oder die Luftblase absaugen. Zu letzterem Zwecke zieht man sich in Glasrohr an einem Ende zu einer feinen Spitze aus und biegt es evtl. so, daß man mit der Spitze die zu entfernende Luftblase gut erreichen kann. Dieses Glasrohr wird über einen Schlauch mittlerer Wandstärke, über den ein Quetschhahn gezogen wurde, mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Bei arbeitender Pumpe schließt man nun mit geschlossenem Hahn mit der Spitze des Glasrohres in die Luftblase hinein und öffnet den Quetschhahn erst dann langsam, wenn sich die Spitze des Glasrohres inmitten der Luftblase befindet. Durch die Pumpe wird nun die Luft abgesaugt. Ist die Blase vollständig verschwunden, so wird der Hahn wieder geschlossen und die Spitze entweder in eine evtl. vorhandene zweite Luftblase eingeführt, oder bei geschlossenem Hahn aus dem Präparatenglas gezogen. Dieses Verfahren ist nur bei größeren Blasen mit mehr als 7–10 mm Durchmesser notwendig, wenn sich diese so am Präparat verfangen, daß sie nicht mehr spontan nach oben steigen können. Kleinere Luftblasen werden in jeder Lage im Laufe der Zeit resorbiert.

Gegenüber der bisherigen Einbettungsmethode mit unverdünntem Celodal weist das oben beschriebene Verfahren folgende Vorteile auf:

1. Durch den Fortfall jeglicher Vakuumanwendung ist die Einbettungstechnik wesentlich vereinfacht und erleichtert, sie verlangt ein Minimum an technischem Können und Geschicklichkeit.
2. Durch die Verdünnung mit Formol tritt eine merkliche Verbilligung der Einbettung ein.
3. Kostspielige, nur für einen speziellen Zweck zu verwendende große Vakuumgefäße kommen in Fortfall bzw. werden nicht benötigt. Die Einbettung mit verdünntem Celodal kann in einfachen, überall vorhandenen Gefäßen vorgenommen werden.
4. Die geringere Viskosität ermöglicht eine bessere Durchtränkung auch konsistenterer Objekte mit dem Einbettungsmittel.

Nach Fertigstellung der Arbeit wurde seitens der Bayerwerke in Leverkusen die Produktion des Celodals wieder aufgenommen. Zur Orientierung sei bemerkt, daß 1 Liter Celodal etwa 9.50 DM kostet, welche Menge jedoch bei Verdünnung mit 5 % Formol 1,35 l gebrauchsfertige Einbettungsmasse ergibt. Bei Bezug größerer Mengen tritt eine Verringerung des Literpreises ein. Es ist der Herstellerfirma jedoch noch nicht möglich, die einzelnen Chargen konstant zu halten, so daß bei der Einbettungsmethode Schwankungen des Formol- und Härtezusatzes um etwa 10 % der angegebenen Werte erfolgen können. Es empfiehlt sich daher gegebenenfalls einen Blindversuch mit einer kleinen Probe anzustellen.

Gegenüber den bisherigen Präparationen hat das in festem Celodal liegende Präparat den Vorteil, absolut unzerstörbar zu sein, so daß auch kostbarste Objekte sicher konserviert werden können. Bei sauberem Arbeiten ist die Einbettung für das Objekt völlig ungefährlich.

Schrifttum

1. H. SCHEUERMANN und K. TAUBÖCK: Ein neues Verfahren zur Herstellung biologischer Demonstrations-Präparate. *Angew. Bot.* XX, Heft 4, S. 317.
2. HOEPKE H.: Celodal, ein neues Einbettungsmittel, Richtlinien für seine Anwendung. *Z. wiss. Mikr.* 56, 453, (1939).
3. W. v. STOKAR: Ein neues Verfahren zur Konservierung von Moorchölzern. *Nachrichtenblatt f. dtsch. Vorzeit.* 15, 145, (1939).

Mayer, Heinr. Th., (Osnabrück), Schmelzharzmontagen. (Ein vielseitig anwendbarer Verschluß mikroskopischer Präparate.) — Eingegangen am 17. IX. 1951.

Die Haltbarkeit mikroskopischer Präparate ist besonders dann mit erheblicher Unsicherheit belastet, wenn flüssige Einbettungsmedien verwendet werden müssen. Eine große Reihe z. T. ziemlich umständlicher Vorschriften sind zu diesem Zweck vorgeschlagen worden. Restlos befriedigen konnte mich keines dieser Verfahren. Im nachfolgenden soll nun ein Verfahren beschrieben werden, das durch Eleganz, Sauberkeit, Haltbarkeit und einfache Technik für sehr viele Zwecke der konservierenden Mikrotechnik geeignet erscheint. Benötigt werden lediglich die im Handel befindliche Guttaperchafolie, sowie ein Ring aus Kupferdraht, der sich an einem etwa 20 cm langem Kupferdraht angebogen und durch Breitschlagen abgeflacht wurde. Man kann dieses Instrument noch in einem Holzgriff befestigen.

Montage bei Trockenpräparaten: Aus der Guttaperchafolie stanzt man sich mit einem Korkbohrer mehrere Ringe, deren Außendurchmesser etwa 1 mm kleiner ist, als das zu verwendende Deckglas. Wenn der Ring etwa 2 mm breit sein soll, ist der Innendurchmesser danach zu bestimmen. Nun legt man einen, oder bei etwas aufragenden Objekten auch 2–3 Ringe übereinander auf den Objektträger, bedeckt mit dem Deckglas, überzeugt sich dann, ob alles richtig orientiert ist und berührt dann den Deckglasrand leicht mit dem angewärmten Drahttring. Sofort schmilzt die Guttapercha und fixiert das Deckglas sauber und unverrückbar auf dem Objektträger. Die Fertigmontage nach dieser Methode dauert 1–2 Minuten. Sind dickere Objekte zu verschließen, dann schneidet man sich einen etwa 0,5 mm breiten Guttaperchastreifen ab, den man zu einem Faden verdreht. Aus diesem Faden biegt man dann einen Ring passender Größe, „lötet“ die Enden zusammen, was leicht mit einem angewärmten Drahtende auszuführen ist und legt diesen Wulst um das Präparat. Heiß gemachte Glasfadenstückchen passenden Durchmessers werden dann in den Ring gedrückt, um das Präparat bei der Fertigmontage vor dem Zerdrücken zu bewahren. Alles weitere geht dann wie schon geschildert vonstatten.

Montage bei Verwendung plastischer oder flüssiger Medien: Sollen Präparate, z. B. in Glyzeringelatine, eingeschlossen werden, so kann man bei einiger Übung genau so verfahren, wie bei der Montage von Trockenpräparaten beschrieben. Man muß lediglich bemüht sein, so wenig als möglich Glyzeringelatine auf den Objektträger aufzubringen, damit beim Zusammensacken der angewärmten Guttapercha noch genügend Raum vorhanden ist, die flüssig werdende Glyzeringelatine aufzunehmen. Sicher geht man, wenn man in der Weise verfährt, die auch für das Einbetten in flüssigen Einschußmitteln zweckmäßig ist. In der oben beschriebenen Weise wird ein Guttaperchawulst passender Dicke angefertigt und auf dem Objektträger durch leichtes Anwärmen von unten angeschmolzen. (Geringste Wärme anwenden wegen der hohen Wärmekapazität des Objektträgers!) Glaskapillaren, die natürlich dünner als der zusammengesinterte Guttapercharing sein müssen, werden vorsichtig warm gemacht und dann in den Guttapercharing eingelegt! Durch leichtes Drehen sorgt man dafür, daß die Glaskapillare allseits von Guttapercha umgeben ist. In diesen Ring gibt man dann das Objekt und soviel des flüssigen Einschußmittels, als voraussichtlich zur Ausfüllung des Hohlraums benötigt wird. Auflegen des Deckglases und Ankleben mittels des erwärmten Drahttringes wie bereits beschrieben. Bei geringem Überschuß an Flüssigkeit kann dieselbe aus den Kapillaren entweichen. Man saugt dann mit Filtrierpapier ab, bricht die Kapillaren hart am Guttapercha ab, reinigt die Hohlfäden durch Einführen von Nähgarnenden soweit als möglich, und führt dann vorbereitende Guttaperchafäden in die Glasröhrchen ein, die schließlich durch kurzes Berühren mit einem heißen Draht verlötet werden. Damit ist die ganze Montage beendet.

Wer gerne einen Lackring zieht, der verwende dazu sog. Relieffarben, z. B. Dekarelieffarben, in allen Künstlerbedarfsgeschäften zu haben. Diese in allen möglichen Farbtönen in Tuben erhältlichen Farben haften vorzüglich auf dem Glas und lösen die Guttapercha nicht auf.

Nicht verwendbar ist diese Technik für alle Medien die Guttapercha lösen, z. B. Kanadabalsam, Cădax, Euparal, Cedernöl, Paraffinöl, äther. Öle, Monobromnaphthalin usw. sowie für die meisten organischen Lösungsmitteln. Lange Sonnenbestrahlung zerstört die Guttapercha. Im Projektionsapparat schmilzt sie natürlich ebenfalls.

Zu ähnlichen Zwecken kann man auch Polyvinylazetat verwenden, das heute im Handel leicht erhältlich ist, aber erst durch Zusatz von Weichmachern zubereitet werden muß. Dieses Material besticht durch seine völlige Farblosigkeit und gestattet auch Präparate herzustellen, die höhere Temperaturen aushalten.

Über die Verwendung weiterer Kunstharze soll nach Abschluß der Arbeiten später berichtet werden.

Es sei aber noch darauf aufmerksam gemacht, daß man nach dieser Methode auch zu Präparaten gelangen kann, welche entweder einen wiederholten Wechsel des Einschlußmittels als auch Anordnungen ermöglichen, die ein permanentes Durchströmen der Mikroobjektkammer zulassen. Zu diesem Zwecke läßt man die Kapillarenden etwa 5 mm aus dem Guttapercharing herausstehen und stellt durch vorsichtiges Überschieben entsprechend weiterer Kapillaren den Anschluß an den gewünschten Flüssigkeitsstrom her. Die Zuführungskapillaren müssen dann in einem Hilfsstativ eingeklemmt werden. In der mikrochemischen Praxis wird das Vorlegen von Tropfen vor die Kapillarenden genügen. Sauber winkelig abgeschnittene Enden sind aber dann für ein exaktes Arbeiten notwendig. Man ritzt mit einem Splitter von synthetischem Rubin vor; Ampullenfeilen sind hier zu grob.

Referate

Freund, H., Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Band V, Mikroskopie des Holzes und des Papiers, Teil I mit 320 Mikro-Aufnahmen, Zeichnungen und Portraits sowie 14 farbigen Mikro-Aufnahmen unter Mitwirkung von W. HOLDHEIDE, B. HUBER, G. LINNEMANN, TH. SCHMUCKER, H. ZIEGENSPECK. XLVI und 456 Seiten; Teil II mit 256 Mikro-Aufnahmen und Zeichnungen sowie 6 farbigen Mikro-Aufnahmen unter Mitwirkung von W. BAVENDAMM, M. HARDERS-STEINHÄUSER, G. JAYME, E. LIEBERT, W. MÜLLER-STOLL, H. v. PECHMANN, R. RUNKEL, H. SCHMIDT. XLVI und 891 Seiten, Frankfurt/Main (Umschau-Verlag) 1951. Preis geb. DM 138,—.

Während viele Gebiete der Mikroskopie seit langem über vorzügliche Lehr- und Handbücher für Instrumentarium und Methodik verfügen, insbesondere Biologie, Medizin und Mineralogie, fehlte bisher eine zusammenfassende Darstellung der mikroskopischen Untersuchungsmethoden und Instrumente in dem ungemein ausgedehnten und vielfältigen Gebiet der Technik. Die Bedeutung der hier vorliegenden Aufgabe erkannt und durch Sammlung hervorragender Mitarbeiter in einem Handbuch in Angriff genommen zu haben, ist das Verdienst des Herausgebers. Mit den beiden vorliegenden Teilen des Bandes V beginnt das auf 8 Bände berechnete Werk zu erscheinen. Seine Ausstattung ist von hervorragender Schönheit, was Papier, Druck und Einband angeht, nicht minder hinsichtlich der zahlreichen ausgezeichneten Mikrophotographien; und der Inhalt der Beiträge bewegt sich auf hohem Niveau; das ist der Gesamteindruck des bisher Vorliegenden; mit Spannung sieht man der Fortsetzung des Werkes entgegen.

Den ersten Teil des Bandes V leiten SCHMUCKER und LINNEMANN (S. 1—77) mit einer „Geschichte der Anatomie des Holzes“ ein, die sehr anziehend geschrieben und mit Bildern der maßgebenden Forscher, ihrer Instrumente und mit Proben aus der Illustration ihrer Werke geschmückt ist. HUBER (S. 79—192) behandelt „Die mikroskopische Untersuchung von Hölzern“, so die Beschaffung der Proben und ihre Vorbereitung zum Schneiden, das Aufbewahren der Schnitte, die Beschreibung der Merkmale, die Anwendung der Mikroprojektion auf diesem Gebiete (hier Erwähnung eines Drehprismas im Projektionsokular zur gewünschten Stellunggebung des Bildes, statt durch Drehen des Objektisches), Bestimmung von Hölzern auf Grund vorhandener Vergleichsstücke, Unterscheidung von Nadel- und Laubhölzern, Rinden, Wurzelhölzern, Auslandhölzern, Bestimmung der Holzeigenschaften durch Schnittfärbung, Untersuchung und Messung der Dimensionen der Elemente und ihres Volum-Anteiles, Datierung von Holzproben auf Grund der Jahrringfolge. HOLDHEIDE (S. 193—368) steuert einen prachtvollen mikrophotographischen Atlas der „Anatomie mitteleuropäischer Holzrinden“ bei, nach vorausgegangener Charakteristik der aufbauenden Elemente. ZIEGENSPECKS (S. 369—456) Beitrag „Der submikroskopische Bau des Holzes im Vergleich mit dem der Fasern im allgemeinen“ wählt als Beispiel eines Nadelholzes die Tanne, eines Laubholzes die Linde und betrachtet hieran und an anderen Fasern und an Haaren die Bedeutung von Polarisationsoptik, Phasenkontrast-Verfahren, Dunkelfeld, Elektronenmikroskop für dieses Gebiet.

Der zweite Teil beginnt mit v. PECHMANNs (S. 457—505) ausgezeichnetem Überblick „Die Mikroskopie in der Holzverarbeitungstechnik“, deren Aufgabe darin besteht, sichere Merkmale für die technischen Holzeigenschaften zu gewinnen, die mechanische Überbeanspruchung des Holzes strukturell zu erkennen, den Einfluß des Trocknens und der Vergütungsverfahren und schließlich die Vorgänge beim Holzschutz (Imprägnierung) und bei pilzkranken Hölzern zu verfolgen. RUNKE (S. 507—543) hat „Die Mikroskopie der Holzfaser“ bearbeitet, wobei unter diesem Begriff alle aus dem Verbands des verholzten Gewebes gelösten Zellwandelemente verstanden werden, wie sie bei der mechanischen, physikalischen, chemischen Behandlung oder Kombination der verschiedenen Verfahren anfallen. Es wird ein Überblick über die Bedeutung des Mikroskopes bei der morphologischen wie stofflichen Charakteristik der Holzfaser gegeben, die insbesondere für Papier, Kunstfasern, Pappe, plastische Massen von Bedeutung ist. JAYME und STEINHÄUSER (S. 545—572) bringen eine genaue Anweisung zur Bestimmung der Faserlänge von Zellstoffen (mit dem Faserprojektionsgerät von Leitz). LIEBERT (S. 573—725) liefert einen sehr inhaltreichen Beitrag „Mikroskopie des Papiers und seiner Rohstoffe“, der vor allem die Prüfmethode hinsichtlich Faserstoffzusammensetzung und Begleitstoffe umfaßt. Die „Mikroskopie des rezenten und fossilisierten Holzes“ behandelt MÜLLER-STOLP (S. 725—816); er betrachtet den strukturellen Ablauf der Zersetzungszustände des Holzes und im Anschluß an die versteinerten Hölzer die Paläobotanik. BAVENDAMM (S. 817—848) schildert „Mikroskopisches Erkennen und Bestimmen von holzbewohnenden und holzzeretzenden Pilzen“, gegliedert in Herstellung von Holzschnitten zur Untersuchung der Pilze und Auswertung derselben, Verhalten von Oberflächenmycelien am Holz und Mikroskopie der aus Holz in Reinkultur gezüchteten Pilze. H. SCHMIDT (S. 845—891) gibt eine sehr gute Darstellung „Die Bestimmung der technisch schädlichen Käfer des Holzes und die dazu benötigten optischen Hilfsmittel, wie Lupe und Mikroskop“ einschließlich der Untersuchung des Inhaltes der Fraßgänge (Kot, Bohrmehl). W. J. Schmidt (Gießen)

Smith, G. M., Manuel of Phycology. An Introduction to the Algae and their Biology. New Series of Plant Science Books, vol. 27. Watham (Mass.); The Chronica Botanica Co., Hamburg 13; Buch- und Zeitschriften-Union mbH. 1951, 375 pp. 48 plates and figures in the text. Preis: \$ 7,50.

Das vorliegende Handbuch der Algenkunde ist das Werk zahlreicher Autoren, die je ein Kapitel der speziellen oder allgemeinen Algologie bearbeitet haben. Einer kurzgefaßten Geschichte der Wissenschaft (PRESCOTT-East Lansing) und einer Diskussion über die Klassifikation der Algen (G. M. SMITH-Stanford) folgt die Behandlung der Chlorophyta (Grünalgen einschl. der Konjugaten, Siphonien und Characeen) (JYENGAR-Madras), Euglenophyta (T. L. JAHN-Los Angeles), Chrysophyta (Xanthophyceae, Chrysophyceae und Diatomeae) (FRITSCH-London), Pyrrophyta (Peridineae) (GRAHAM-Sarasota), Phaeophyta (PAPENFUSS-Berkeley), Cyanophyta (DRUET-Chicago) und Rhodophyta (DREW-Manchester); es folgen eine Behandlung der fossilen Algen (JOHNSON-Golden) und eine Reihe von Kapiteln, welche Fragen der allgemeinen Algologie behandeln — die Zytologie der Algen (BOLD-Nashville Tennessee) umfaßt etwa 30, die Lehre von ihrer Sexualität (G. M. SMITH-Stanford) etwa 10 Seiten; eingehend werden die Farbstoffe der Algen von H. H. SRAIN-Stanford) und ihre Physiologie und Chemie von BLINKS-Stanford; die Ökologie der Süßwasseralgen (TIFFANY-Ivenstone) und die der marinen (FELDMANN-Paris) auf je 20 Seiten behandelt. Es folgt ein Kapitel über das Plankton (B. H. KETCHUM-Woodshole). Für die Interessen unserer Zeitschrift

sind als besonders wichtig zu nennen die Berichte von E. G. PRINGSHEIM-Cambridge über die Kulturmethode und JOHANSENS Mikrotechnik (Pomona, Cal).

Die Aufteilung des Stoffes und seine Bearbeitung durch zahlreiche Algologen bringt den Vorteil, daß wir uns über alle Algengruppen und viele Fragen der Algologie von besonders erfahrenen Kennern belehren lassen können. In den Kapiteln, die die Klassifikation der Algen und die Morphologie der Braun- und Rotalgen, die fossilen Formen, die Ökologie der Algen und anderes behandeln, kommen viele Einzelheiten zur Sprache, die in andern Handbüchern nicht oder mit geringerer Ausführlichkeit behandelt werden. Jedem Kapitel ist eine ausführliche, bis in die letzten Jahre reichende Bibliographie beigegeben. Andererseits nötigt die Bearbeitung des umfangreichen Stoffes durch viele Autoren den Leser nicht selten dazu, sich über die gleichen oder einander sehr nahe stehende Fragen an mehr als einer Stelle zu informieren; zytologische Fragen werden ausführlich in den die Chrysophyten, Peridineen, Zyanophyzen u. a. behandelnden Kapiteln zur Sprache gebracht, später in Kap. 11 (Zellenlehre) nochmals eingehend besprochen.

Seit der 2. Auflage des „Oltmanns“ (1922, 1923) ist keine Neubearbeitung des umfangreichen Stoffes in deutscher Sprache mehr gegeben worden; das vorliegende Werk macht deutlich, wie eifrig inzwischen die Algenforscher am Werk gewesen sind — es wird daher auch in deutschen Instituten begrüßt und gern benutzt werden.

Küster (Gießen)

Kosmos-Lexikon der Naturwissenschaften mit besonderer Berücksichtigung der Biologie, Lieferung 1 A—An und 2 Au—Bo. Kosmos Gesellschaft der Naturfreunde, Stuttgart (Francksche Verlagshandlung).

Das auf 12—14 Lieferungen (zu je DM 2,50) berechnete, 15000 Stichwörter, viele Tafeln, auch farbige, Zeichnungen und Tabellen enthaltende, von einem Dutzend Autoren bearbeitete Werk, liegt in der ersten und zweiten Lieferung vor, die nach der sorgfältigen Formulierung der größeren Artikel und der kurz erläuterten Fachausdrücke und Hinweise, nach Druck- und Bildbeigaben einen sehr ansprechenden Eindruck erwecken. Das Werk wird bei dem geringen Preise weitesten Kreisen zugänglich sein.

W. J. Schmidt (Gießen)

Patzelt, V., Das Mikroskop und seine Nebenapparate im Dienst der Naturwissenschaften, Medizin und Technik. Mit einem Beitrag über Polarisationsmikroskopie von F. RAAZ. Mit 118 Abbildungen, darunter 4 Farbbilder. Wien 1950 (Georg Fromme & Co.). 154 Seiten, Halbleinen, Preis DM 18,—.

Das vorzüglich ausgestattete Buch gibt eine auf die Praxis des Mikroskopikers zugeschnittene klare und anregende Erläuterung von Wirkungsweise und Gebrauch des Mikroskopes und seiner Nebenapparate — bis zu den neuesten Erfindungen wie Elektronenmikroskop, Phasenkontrastverfahren und Spiegelmikroskop — vorwiegend unter Bezugnahme auf die Erzeugnisse von C. Reichert, Wien. Die Erklärung vieler über den Haupttext hinausgehender Einzelheiten ist in die Legenden zu den Abbildungen verlegt, die (mit Ausnahme der Abbildung 57) geschickt gewählt wurden. — Irrig ist die Auffassung (S. 92/93), daß die v. EBNERsche Phenolreaktion auf Behebung von Formdoppelbrechung beruhe; vielmehr handelt es sich bei ihr um einen topochemischen Vorgang, der unabhängig von der Brechzahl der benutzten Flüssigkeit ist, z. B. ebenso von der schwachlichtbrechenden Pikrinsäurelösung wie von dem stark lichtbrechenden Nelken- oder Zimtöl hervorgerufen wird. Auch kann man an Proteinfibrillen mit Kongorot keinen merklichen Dichroismus erzeugen (S. 94). Der Beitrag von RAAZ berücksichtigt vornehmlich die Bedürfnisse des Mineralogen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Küster, E., Die Pflanzenzelle. Vorlesungen über normale und pathologische Zytomorphologie und Zytogenese. Zweite, neubearbeitete Auflage. Mit 442 Abbildungen im Text. Jena (G. Fischer) 1951. XII und 866 Seiten. Preis Ganzleinen DM 54,—.

Nach 15 Jahren erschien die 2. Auflage des weithin bekannt gewordenen Werkes bei gleicher Stoffanordnung, bereichert um neue Bilder — darunter viele vom Autor und seinen Schülern — und um manche Einzelheiten im Text. Das war ohne wesentliche Vergrößerung des Umfanges nur möglich durch straffere Fassung der Darstellung, die nach Meinung des Ref. dem Buche zugute gekommen ist und weder eine Lesbarkeit noch den Charakter von Vorlesungen beeinträchtigt. Die Vorlesungen wenden sich gewiß nicht an den Anfänger in der Botanik, sondern setzen Vertrautheit mit den Grundtatsachen voraus, führen den Fortgeschrittenen bis zu den neuesten Forschungsergebnissen und ermöglichen dem Leser an Hand der umfangreichen Literaturverzeichnisse noch weiteres Eindringen. Auch außerhalb des Kreises der Botanik wird das Werk von Nutzen sein. Denn eine allgemeine Zellenlehre kann nur aus der Betrachtung der Tatsachen in Pflanzen- und Tierreich erwachsen. Einen solchen Überblick zu gewinnen, wird aber durch die wachsende Fülle der Tatsachen und die steigende Flut der Veröffentlichungen immer schwieriger. Gern wird daher auch der Zoologe zu KÜSTERs Werk greifen, um sich rasch und zuverlässig über all das zu unterrichten, was in das große Gebiet der pflanzlichen Zellmorphologie fällt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Bräutigam, F., u. Grabner, A., Beiträge zur Fluoreszenz-Mikroskopie. Mit 26 Abbildungen, davon 20 Farbbilder auf 10 Bildtafeln. Wien 1949 (Georg Fromme & Co.). 130 Seiten, Hln. DM 24,—.

Die zehn dem Andenken MAN HAITINGERS gewidmeten Arbeiten behandeln sehr verschiedene Themen aus dem Gebiet der Fluoreszenz-Mikroskopie:

BRÄUTIGAM und GRABNER (S. 25—35) geben einen historisch gegliederten Überblick der „Fluoreszenz-Mikroskopie“. EPPINGER (S. 37—45) berichtet über „Die Bedeutung der Fluoreszenz-Mikroskopie für die Pathologie“ insbesondere den Nachweis des aus den Gefäßen ausgetretenen Blutplasmas auf Verabfolgung von Histamin („Albuminurie ins Gewebe“), wie er vor allem in der Leber eintritt. Als Fluorochrom bewährte sich vor allem Thiazinrot (die Rezepte werden angegeben). Auch die „seröse Entzündung“ anderer Organe läßt sich auf diesem Wege erforschen. K. HÖFLERS Beitrag behandelt „Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen“ (S. 46—70) unter Verwendung von Acridinorange, Rhodamin B, Pyronin. Die Beobachtungen betreffen die Beurteilung des Lebenszustandes, die Speicherung ionisierten und molekularen Farbstoffes und die „vollen“ und „leeren“ Zellsäfte, die sich durch ihre Grün- oder Rotfluoreszenz nach Acridinorange-Färbung unterscheiden, deren erste Farbstoffmolekeln binden, deren zweite seine Ionen speichern. H. ZIEGENSPECK (S. 71 bis 85) schildert „Die Emission polarisierten Fluoreszenz-Lichtes (Diffluoreszenz) durch gefärbte Zellulose und Cutinmembranen von Pflanzen“. Er benutzt vornehmlich den Univertor von Busch oder den Ultropak von Leitz (Relief-Kondensor) mit Trockenobjektiven und mit Dichroskopular oder Aufsatz-Analysator und zwar im blauen durch Filter gewonnen Licht. Ähnlich dem Dichroismus liefern Fasern polarisiertes Fluoreszenzlicht, meist nur nach einer Schwingungsrichtung (der Länge), seltener nach beiden Schwingungsrichtungen verschiedenfarbiges. S. STRUGGERS (S. 86—101) Beitrag „Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien“ berücksichtigt die Fluorochromierung fixierter und lebender Bakterien und die Fluoroskopie von Bodenbakterien.

HABERLANDT und KÖHLER (S. 102—118) berichten über „Die Bedeutung der Fluoreszenz in der Mineralogie und Petrographie“. Die bisherigen zahlreichen und wertvollen Beobachtungen sind meist ohne Mikroskop mit der Fluoreszenz-Lampe angestellt und betreffen die Primärfluoreszenz. Untersuchungen im Fluoreszenz-Mikroskop liegen auf petrographischem Gebiet nur spärlich vor; doch erscheint auch hier die Verwendung von Fluorochromen nicht ausichtslos. HÖFLER und TH. MÜLLNER-HAITINGER bringen Angaben „Zur Wirkung des Coriphosphins auf die Pflanzenzelle“; auch mit diesem Farbstoff lassen sich „volle“ und „leere“ Zellsäfte unterscheiden. Zellmembranen färbt der Farbstoff echt gegen Auswaschen, resistent gegen Salzkationen und zwar auch unterhalb des isoelektrischen Punktes. V. PATZELT (S. 127—130) referiert „SJÖSTRANDs Verfahren zur Feststellung einer Eigenfluoreszenz in animalen Geweben sowie seine Befunde in diesen und besonders in der Niere“.

W. J. Schmidt (Gießen)

Patzelt, V., Histologie. Der Feinbau des menschlichen Körpers und seine Entwicklung. Ein Lehrbuch für Mediziner. Dritte, verbesserte Auflage. Mit 686 Abbildungen im Text und auf 32 farbigen Tafeln. Wien (Urban & Schwarzenberg) 1948. X u. 546 Seiten. Preis Hln. DM 33,—.

Hervorgegangen aus J. SCHAFFERS Lehrbuch liegt das Werk seines Nachfolgers nun bereits in dritter Auflage vor, die hohe Tradition der Wiener Histologenschule wahrend. Wenn auch zahlreiche Abbildungen aus SCHAFFERS Buch übernommen wurden, so ist doch ein großer Teil der reichen Illustration späteren Ursprungs, nicht nur was die farbigen Tafeln angeht, sondern auch die Mikrophotogramme, die, von guten Präparaten aufgenommen, sich auch im Lehrbuch ihren Platz errungen haben. Ferner tritt gegenüber SCHAFFERS Werk die Embryologie mehr hervor. So gibt das Buch von der Cytologie bis zum Aufbau der Organe einem jeden zuverlässigen Aufschluß, der histologischer Daten bedarf, dem Studierenden der Medizin ebenso wie dem Ärzte, Anatomen, Physiologen, Pathologen, Zoologen. Denn die Behandlung von Einzelheiten geht erlieblich über das hinaus, was vom Studierenden als Examensstoff verlangt wird; hält das Buch doch die Mitte ein zwischen einem Lehrbuch für das Hochschulstudium und einem Handbuch der Histologie. Für die nächste Auflage möchte Ref. darauf hinweisen, daß die VOLKMANNschen Kanäle nicht durch Resorption entstehen, wie sich an Hand der Polarisationsoptik eindeutig zeigen läßt [vgl. W. J. SCHMIDT 1959 in „Neue Ergebnisse und Probleme der Zoologie“ (KLATT-Festschrift) S. 854—866].

W. J. Schmidt (Gießen)

Mohler, H., Chemische Optik. Mit 165 Abbildungen. Aarau (H. R. Sauerländer & Co.) 1951. 296 Seiten. Leinen, Preis Schw. Fr. 23,—.

Das vorzüglich ausgestattete Buch wendet sich in erster Linie an den Chemiker, ist aber auch für Mediziner und Biologen von Bedeutung, überhaupt für jeden, der aus der Wechselwirkung von Licht und Materie Schlüsse auf die Struktur ziehen oder Substanzen auf diesem Wege identifizieren oder bestimmen will. Der I. Teil vermittelt die erforderlichen Grundkenntnisse über Licht und Materie, der II. Teil behandelt Messungen mit monochromatischem Licht (Refraktometer, Messung der Kerr-Konstante, der magnetischen und der Strömungs-Doppelbrechung, der Drehung der Polarisationssebene durch optisch aktive Stoffe, ferner die Photo-, Kolori-, Nephelo- und Fluorometrie), der III. Teil Messungen mit spektral zerlegtem Licht (Spektroskopie emittierender Körper, Spektralphotometrie im leicht und schwieriger zugänglichen Spektralbereich — Vakuumultraviolett und Ultrarot —, Röntgen- und Elektroneninterferenzen), der

IV. Teil die Zusammenhänge zwischen optischen Eigenschaften und chemischer Konstitution (an Hand von Mol-Refraktion, Absorption, optischer Aktivität). Überall werden die Methoden nach Prinzip, Wesen der Apparatur und Anwendungsbereich in vortrefflicher Klarheit dargelegt. Der Autor hat es vermieden, Apparaturen bestimmter Firmen zu schildern; hierfür stehen ja dem Benutzer die von diesen herausgegebenen Anleitungen zur Verfügung. Doch wäre eine kurze Zusammenstellung der im Handel erhältlichen Instrumente und ihrer Hersteller erwünscht. Der Schlußsatz des Buches lautet: „Der heutige Forscher ist bescheidener geworden. Er versucht nicht mehr zu erklären, er beschreibt, denn er weiß allein sicher, daß er nur Projektionen eines Etwas erkennt, das er nicht erklären kann.“

W. J. Schmidt (Gießen)

Langeron, M., Précis de Microscopie. Technique — Expérimentation — Diagnostic. Septième édition entièrement refondue avec 392 figures dans le texte et un frontispice. Paris (Masson et Cie.) 1949. VIII und 1430 Seiten. Preis brosch. 3000 Fr., cart. 3600 Fr.

Das bereits in 7. Auflage vorliegende Werk behandelt die Bedürfnisse der praktischen Mikroskopie vornehmlich des Mediziners, jedoch in einer so umfassenden Art, daß es auch für den Biologen im allgemeinen von großem Wert ist, in Deutschland besonders deshalb, weil in ihm über Instrumente und Verfahren berichtet wird, die hier noch kaum bekannt geworden sind. Es gliedert sich in 3 Teile: I. Mikroskop und Nebenapparate (S. 1—353), II. Allgemeine Methoden der mikroskopischen Technik (S. 354—753), III. Spezielle Methoden (S. 755—1387), geordnet nach Objekten (Protozoen, Würmer, Anneliden, Histochemie, färberische Analyse, pflanzliche Histologie, Bakteriologie und dgl.). Dann folgen noch Zusammenstellungen physikalischer und chemischer Daten, deren der Mikroskopiker öfter bedarf. Das Werk enthält eine Fülle vortrefflicher Ratschläge, begründet auf reiche Erfahrungen, die klar und wohlgeordnet dem Leser dargeboten werden; es sollte in der Bibliothek keines Mikroskopikers fehlen.

Wenn im folgenden auch auf einige Mängel aufmerksam gemacht wird, so geschieht das im Hinblick auf eine künftige Auflage: Bei der Besprechung der Beleuchtung wäre ein Hinweis angebracht, sie nach Ausheben des Okulars in der hinteren Öffnung des Objektivs zu kontrollieren. Man vermißt die Erwähnung der Zweiblendenkondensoren und die Hervorhebung der Bedeutung einer Sehfeldblende überhaupt. Zu den Ersatzmitteln für Cedernöl gehört auch Anisol (S. BECHER), dessen optische Konstanten denen des Cedernöls sehr nahe stehen, das nicht verharzt, vielmehr langsam abdunstet, so daß es nicht vom Präparat abgewischt zu werden braucht. Eine Feinbewegung „ohne Ende“ ist nicht empfehlenswert, da bei ihr stets geprüft werden muß, in welchem Bereich sie sich befindet, bevor man Heben und Senken des Tubus zur Beurteilung von Lichtbrechung und Relief mit Sicherheit benutzen kann. Auf S. 227 wird irrtümlich gesagt: „Quand la teinte monte, l'axe de plus petite élasticité de l'objet correspond à l'axe de plus grande élasticité de la lame de gypse . . .“; denn beim „Steigen der Farbe“ liegen gleichsinnige Achsen von Objekt und Vergleichsplatte übereinander. Wenn Verf. (S. 230) meint, daß das polarisierte Licht leider noch zu wenig verwendet würde, so möchte Ref. doch darauf hinweisen, daß allein in den letzten fünfzehn Jahren mehrere Hundert biologische Arbeiten erschienen, die von diesem Mittel Gebrauch machten [vgl. Sammelreferate von W. J. SCHMIDT in „Protoplasma“ **29** (1937), 300—312, und 435—467, **34** (1940), 237—313, **37** (1942), 86—153]. Leider fehlen bei LANGERON Angaben über die spezifische Behandlung der Präparate für Untersuchungen in polarisiertem Licht wie Imbibitionsverfahren und dichroitische Färbungen so gut

wie ganz, so daß der Leser keine Vorstellung von ihrer großen Bedeutung erhält [vgl. hierzu W. J. SCHMIDT, Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth. Abt. V Teil 2.2, 1835—1924 (1931), Teil 10, 435—665 (1934), 827—875 (1935)]. Bemerkenswert sind die Ausführungen über Mikroskope, bei denen das polarisierte Licht durch Reflexion an Glas gewonnen wird (nach COTTON und MANIGAULT, Hersteller LANDRIAULT, Paris); auch monokulare und binokulare Lupen solcher Art werden vorgeführt. Unter den Dunkelfeldkondensoren wird auch der nach LOCCQUIN beschrieben, bei dem das Präparat, auf einer Glashalbkugel liegend, in Cedernöl in der parabolischen Höhlung des Reflektors versenkt und auf den Brennpunkt eingestellt wird; er soll viel hellere Bilder liefern als andere Kondensoren. Als Mikromanipulatoren werden die von DE FONBRUNE (siehe Referat Z. wiss. Mikr. 60, 507 . .) und der einfache Pantographmikromanipulator nach BROWAEYS geschildert. Der Abschnitt über Mikrophotographie ist im instrumentellen Teil etwas dürftig, indem nur der für Projektion, Zeichnen und Photographie bestimmte Apparat von LEROUX des näheren geschildert wird. Bei den Oxychinon-Farbstoffen nach BECHER wäre der Hinweis angebracht, daß die mit ihnen erhaltenen Kernfärbungen absolut licht- und balsamfest sind. Die Angabe der Brechungsindices der Einschlußmittel wäre erwünscht.

W. J. Schmidt (Gießen)

Meyer, W., Lehrbuch der normalen Histologie und Entwicklungsgeschichte der Zähne des Menschen. (2. verbess. u. erweit. Aufl. mit 360 Abb. im Text u. auf Tafeln. München (Carl Hanser) 1951. 223 S., geb. DM 26,—.

Das bewährte Buch liegt sehr gut ausgestattet bei angemessenem Preise in zweiter Auflage vor (1. Auflage 1932) und dürfte über den Kreis der Zahnärzte hinaus bei Anatomen und Zoologen Interesse finden. Aus den vorzüglichen z. T. farbigen Originalphotogrammen seien besonders hervorgehoben die Abb. 60—64, Wiedergabe isolierter Odontoblastenfortsätze, so gewonnen, daß der Zahn durch Behandlung mit 50%iger Salz- oder (Salpeter-)säure seiner Dentinegrundsubstanz beraubt und dann in Gefrierschnitte zerlegt wurde; Pulpa, Odontoblasten und ihre Fortsätze bleiben dabei erhalten. Wenn auch das Buch durch seine klare Darstellung sehr empfehlenswert ist, so muß doch als Mangel bezeichnet werden, daß Verf. weder die Methodik noch die Ergebnisse der Untersuchung der Zahnhartsubstanzen in polarisiertem Licht erwähnt, obwohl doch nur auf diesem Wege die Natur der Globuli und Arkaden als Calcosphäriten und der Vorgang der Schmelzhärtung aufgeklärt werden kann und das polarisierte Licht auch für die Erforschung des Kollagenfaserverlaufs im Dentin wertvolles leistet. Die auf S. 5 vertretene Auffassung, die Oberflächenvergrößerung, welche der Schmelz bei seinem Dickenwachstum erfährt, werde durch Dickenzunahme der Prismen ausgeglichen, ist nicht genügend begründet; vielmehr sind hier die Darlegungen von J. WOLF (D. Zahn- usw. Heilkde. 9, 1942) zu berücksichtigen. Auch läßt sich die Entstehung der Diazonien und Parazonien nicht in der einfachen Weise erklären, wie Verf. S. 169 unten es andeutet (vgl. hierzu W. J. SCHMIDT, D. Zahnärztl. Z. 4, 1949). Ferner möchte Referent darauf hinweisen, daß im Umkreis der TOMESSchen Fasern öfter Besonderheiten der Verkalkung (polarisationsoptisch) sich erkennen lassen, was darauf hinweist, daß doch an diesen Stellen Unterschiede der organischen Grundlage hinsichtlich der Umgebung bestehen, auch wenn es sich nicht um isolierbare NEUMANNschen Scheiden handelt.

W. J. Schmidt (Gießen)

atthey, R., Les Chromosomes des vertébrés. Avec 48 figures dans le texte et 35 planches groupant 442 figures. Lausanne (F. Rouge) 1949. 356 Seiten, Preis brosch. 48 S. fr.

Verf. hat eine sehr sorgsame Zusammenfassung der bisherigen Kenntnisse über die Chromosomen der Wirbeltiere geschaffen, die nach Angaben über die Technik (s. u.) zunächst einen allgemeinen Überblick der wichtigsten Arbeiten auf diesem Gebiete bringt, geordnet nach den Klassen der Vertebraten, dann ins Einzelne gehend die Geschlechtschromosomen behandelt und schließlich die Evolution der Chromosomen in ihren Beziehungen zu Phylogenie und Systematik. So ein Werk entstanden, das für den Genetiker und den Cytologen, der auf diesem Gebiete arbeitet, schlechthin als unentbehrlich betrachtet werden kann und dessen Ergebnisse auch vom Deszendenztheoretiker und Systematiker beachtet werden müssen. Die Ausstattung nach Papier und Druck ist vorzüglich.

Hier interessieren vor allem die einleitend mitgeteilten Erfahrungen zur Technik der Chromosomendarstellung. Es ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß ein Fixierungsmittel, das bei einer Wirbeltiergruppe gute Ergebnisse (am besten bei Mäusen) liefert, bei einer anderen keineswegs befriedigend wirkt, besonders hinsichtlich des Vermeidens der Verklumpung von Chromosomen. Am besten bewährt sich die Flüssigkeiten nach FLEMMING, HEITZ und CHAMPY, die für alle Klassen gute, bei Reptilien und Säugetieren ausgezeichnete Ergebnisse liefern. Dabei ist Voraussetzung, daß dem Hoden mit gutschneidender Schere Stückchen nicht über 1,5 mm Durchmesser entnommen werden. Diese kommen in einem Röhrchen, das beiderseits mit lockerem Stoff (Organdy) verschlossen ist, für 24 Stunden zum Auswaschen in fließendes Wasser, dann zur Entwässerung für 10 Minuten in 70%igen und für 2 mal 45 Minuten in einmal gewechselten 96%igen Alkohol, weiter in einmal gewechseltes Cedernöl für 2 × 12 Stunden. Dann wird nach Abspülen in Toluol (10 Sekunden) das Röhrchen in ein Bad von Toluolparaffin (Schmelzpunkt 30°) gebracht und zwar für 10 Minuten in den Wärmestrand bei 58°. Darauf gelangt das Röhrchen in reines Paraffin für 20 Minuten und eine Stunde. Schließlich wird der Stoff am unteren Ende des Röhrchens rasch entfernt und die Stücke in einen Zinn-Napf in reines Paraffin zum endgültigen Anschluß gebracht. Dieses 2. Bad dauert 20 Minuten. Schließlich wird der Napf nach Verfestigung der Oberfläche des Paraffins in lauwarmes Wasser gebracht und regelmäßig nicht vor 24 Stunden in 10–12 μ dicke Schnitte zerlegt. Verf. empfiehlt in meisteilen die Dreifachfärbung nach FLEMMING (Safranin, Gentianaviolett, Eosin, orange G). Bei guter Fixierung hört die Differenzierung der Schnitte von selbst am gewünschten Punkt auf. Für die FEULGENsche Färbung erhält man nach Fixation mit der FLEMMING-HEITZschen Flüssigkeit ausgezeichnete Ergebnisse (10 Minuten Hydrolyse bei 56° und Färbung eine Stunde). Die FEULGEN-Färbung ist unentbehrlich für das Studium der Chromosomen in der Oogenese. Weiter werden wichtige Ratschläge über die Art der Untersuchung der Präparate und die schematische Darstellung der Ergebnisse (Karyogramme).

W. J. Schmidt (Gießen)

ara, M., Entwicklungsgeschichte des Menschen. Vierte erweiterte Auflage mit 237 Abbildungen. XII u. 586 S. Heidelberg 1949 (Quelle & Meyer). Halbleinen DM 28,—.

Das der Sammlung „Hochschulwissen in Einzeldarstellungen“ angehörige Buch ist nun in vierter Auflage vor, an manchen Stellen verbessert und bereichert und die seit der letzten Auflage gewonnenen neuen Einsichten. Wenn auch der Mensch das Objekt der Darstellung bildet, so steht doch das Ganze unter allgemein biologischen Gesichtspunkten und so ist das Buch nicht nur für den Studierenden

der Medizin und den Arzt empfehlenswert, sondern für jeden Naturwissenschaftler biologischer Fachrichtung. Es stellt nicht einen Abriß dar, der nur das Notwendigste bringt, sondern ein Werk, das vom Leser eine gewisse Mitarbeit verlangt, die sich reichlich lohnt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Matthes, E., Leitfaden für das Zoologische Praktikum von V. Kükenenthal, 12. Aufl. Mit 206 Abbildungen im Text. Stuttgart (Piscator Verlag), 1950. VIII u. 360 S. Leinen DM 16,50.

In schöner Ausstattung liegt die 12. Auflage des bekannten, wohl in keinem zoologischen Laboratorium fehlenden Buches vor. Sie unterscheidet sich von der vorhergehenden durch Aufnahme einer Planarie unter die Übungsobjekte, Erweiterung der Darstellung von Blatta und Fasciola, Einschalten neuer und auch einiger älteren Abbildungen. So wird das treffliche Buch auch weiterhin die guten Dienste tun wie in dem seit der ersten Auflage (1898) verstrichenen halben Jahrhundert.

W. J. Schmidt (Gießen)

Schummer, A., Vereinfachtes Plastoid-Korrosionsverfahren. (Anat. Anz. Bd. 98, 288—290, 1951).

Während man bisher das monomere dünnflüssige „Plastoid“ (Chemische Fabrik Röhlm & Haas, Darmstadt) nach Zusatz eines Katalysators durch Kochen im Ölbad bei 130 bis 140° C in den zur Injektion notwendigen viskösen Zustand versetzen und dann rasch abkühlen mußte, um die fortschreitende Polymerisation zu unterbinden, werden jetzt 5 Gewichtsteile des mit der gewünschten Plastoidfarbe eingefärbten dünnflüssigen Plastoids mit 3 Gewichtsteilen Plastoidpulver vermischt, das in kleinen Portionen unter ständigem Schütteln der Flüssigkeit zugesetzt wird; dann erhält man eine homogene zähflüssige Masse, die, kühl und dunkel aufgehoben, wochenlang brauchbar bleibt und, etwa zu fest geworden durch Zusatz dünnflüssigen Ausgangsmaterials wieder in den zur Injektion brauchbaren Zustand versetzt werden kann. Man injiziert die Flüssigkeit in 1—2 Tag kühl aufgehobene Organe mit einer kleinkalibrigen Rekordspritze (20 ccm Inhalt mit Veterinärkonus und entsprechender Knopfkanüle. Die Spritzen werden nach Entfernen des Kolbens von oben her gefüllt; nach der Entleerung wird der Kolben nicht hochgezogen, sondern die Spritze in Benzol oder Azeton gelegt und dann erst der Kolben unter gleichzeitigem Aufsaugen von Lösungsmittel entfernt. Erst dann kann von oben erneut mit Plastoid gefüllt werden. Nach der Injektion kommt das Präparat in einem 2—3%igen Formolbad in den Thermostat, erwärmt zunächst auf 35° und dann auf 40—45° C, für 24—48 Stunden. Anschließend wird das Präparat in 30—35%ige Kalilauge gelegt, welche die Weichteile rasch korrodiert. Nach Abhebern der Lauge wird das Präparat in fließendem Wasser gesäubert und werden etwaige Reste von Knochensubstanz durch Einlegen in konzentrierte Salzsäure beseitigt, worauf erneutes Wässern folgt. Die feinsten Kapillaren werden formgerecht wiedergegeben und man kann vorteilhaft die Präparate mit dem stereoskopischen Lupe betrachten.

W. J. Schmidt (Gießen)

Smith, A. U., Polge, C., u. Smiles, J., Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. With 7 plates and one textfigure. (J. roy. micr. Soc. (3) vol. 71, 186—195, 1951).

Zum Gefrieren und Auftauen von Spermien, Blutzellen, Amöben dient ein besonderer Objektträger aus „Perspex“ (wohl ein Kunstharz), der durch gut isolierendes Material (Kork, Isolationsband) gegen den Objektisch abgeschützt ist.

Die Kälte- oder Wärmezufuhr erfolgt durch zwei Kupferstreifen, die in zwei verstellbare Thermosflaschen beiderseits des Mikroskops mehr oder minder tief eintauchen, die mit flüssiger Luft oder heißem Wasser gefüllt werden; die Temperaturmessung geschieht mittels Thermoelement. Zur Projektion wurde eine Quecksilberhochdrucklampe benutzt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Fairs, G. L., Developments in the technique of particlesize analysis by microscopical examination. With 7 text-fig. and 5 tables. (J. roy. micr. Soc. (3) **71**, 209—222, 1951).

Das Verfahren beruht auf dem Vergleich der Partikelgröße mit einer Reihe von kalibrierten (leeren oder gefüllten) Kreisen auf einem Okularnetzmikrometer. Ursprünglich geschah das im Binokularmikroskop, bequemer aber ist Projektion mit einer Hochdruck-Quecksilber-Lampe. Je nach der Partikelgröße müssen verschiedene Objektive benutzt und damit den Vergleichs-Kreisen verschiedene reelle Werte zugeordnet werden. Beim Vergleich sind verschiedene Umstände zu beachten wie die Kontrolle der Fehlergröße, der Formfaktor u. dgl., worüber des näheren berichtet wird.

W. J. Schmidt (Gießen)

Gray, P., and Wess, G., The use of polyvinyl alcohol and its derivatives as microscopical mounting media. Part II Hydrocarbon-miscible mounting media (J. roy. micr. Soc. [3], **71**, 196—199, 1951).

In neuerer Zeit sind an Stelle von Canadabalsam mancherlei Stoffe als Einbettungsmedien empfohlen worden, über welche in der Einleitung berichtet wird. Die Verf. stellen ein solches Mittel mit $n_D = 1.474$ her aus einer 23%igen Dispersion von Polyvinylacetat in „Cellosolve“ mit 30% Diamylphthalat als Weichmacher. Erwärmt trocknet das Medium in 2—3 Tagen zu einer glashellen Masse ein, die weder Ehrlichs Eisenhämatoxylin-Eosin B noch Mallorys Fuchsin-Orange-Anilinblau-Färbung in 6 Wochen angriff, trotzdem die Präparate teils Zimmertemperatur und gewöhnlichem Licht, teils einer Temperatur von 60° C bei Tagesbeleuchtung oder dem Licht einer 500-Watt-Birne auf 25 cm Entfernung bei 54° C ausgesetzt wurden.

W. J. Schmidt (Gießen)

Soares, A. D., Contribucao para o estudo das reacões alérgicas do rim. (Arg. Instituto Bact. Câmara Pestana. vol. **9**, 251—343, pl. 18—28, 1949).

Die Untersuchung der allergischen Reaktionen der Niere des Meerschweinchens nach den verschiedensten Eingriffen wie Nephrektomie, Sensibilisierung mit Eieralbumin, Antigen, Nephrotoxin erfolgte an Schnitten, die vor allem mit der Weigertschen Fibrinfärbung, nach Mallory und van Gieson gefärbt wurden. Die Ergebnisse werden an zahlreichen Schwarz-Weiß-Photogrammen und einigen farbigen Bildern erläutert.

W. J. Schmidt (Gießen)

Kisch, A. J., Predecessors of the glass micrometer. (J. roy. micr. Soc. (3) vol. **71**, 181—185, 3 plates, 1 textfig. 1951).

Interessante historische Angaben über ältere Mikrometer für Messungen mittels des Mikroskops. Die Tafeln geben eine tragbare Camera obscura mit Cuffer Sonnenmikroskop, weiter ein Cuffisches Mikroskop von 1744 (nach Baker) wieder und ein Silberdraht-Mikrometer von Cuff (London), Zubehör eines Mikroskops vorgenannter Art im Besitz des Verfassers.

W. J. Schmidt (Gießen)

Pipper, A., and Kistner, A., Slides and cover glasses for dark ground microscopy, with 2 plt. (J. roy. micr. Soc. (3) vol. **71**, 176—180, 1951).

Für gute Dunkelfeldbilder bei starker Lichtquelle reichen Objektträger und Deckgläser sehr oft nicht aus, weil sie von der Herstellung herrührende Fehler im Inneren oder auf der Oberfläche besitzen, die bei diesem Beobachtungsverfahren zum Vorschein kommen; das gilt nach den Erfahrungen des Verfassers auch für Objektträger und Deckgläser aus geschmolzenem Quarz. Er empfiehlt auf die Objektträger eine Glimmerplatte mit Canadabalsam aufzukitten und durch Abspalten einer dünnen Lage dann eine vollkommen einwandfreie Oberfläche herzustellen; ein Verfahren, das mehrfach wiederholt werden kann.

W. J. Schmidt (Gießen)

Hartshorne, N. H., and Stuart, A., The teaching of the use of the polarizing microscope. with 6 plt. (J. roy. micr. Soc. (3) vol. **71**, 200—208, 1951).

Die Verf. geben Anweisungen für den Unterricht in der Handhabung des Polarisationsmikroskops, insbesondere durch Angabe geeigneter Modelle.

W. J. Schmidt (Gießen)

Reichardt, H., Bemerkungen zur Präparationstechnik bei Stechmücken. Mit 3 Abb. (Zool. Anz. **147**, 271—273, 1951).

Ein Objektträger wird mit einer dünnen gleichmäßigen Paraffinschicht (mittels Deckglasspatels) überzogen; sie soll Gleiten des Objektes verhindern. Die mit Äther getötete Imago (am besten frisch geschlüpft) wird auf den Paraffinbelag gelegt und darüber ein Deckglas auf Plastlinfüßchen abgestützt; diese ruhen auf Glasfüßchen an den vier Ecken des Objektträgers, die dort nach Beseitigung des Paraffinbelages mit Canadabalsam aufgeklebt wurden. Durch vorsichtigen Druck aufs Deckglas wird das Objekt genügend dem Objektträger angelegt. Nach Einschieben eines kleinen Karbolsäure-Kristalls zwischen Objektträger und Deckglas wird das Präparat durch Paraffin oder Lack luftdicht abgeschlossen. Dauerpräparate von Eiern, welche am sichersten die Unterscheidung der Anopheles-Rassen ermöglichen, erhält man so, daß die eingefangenen Weibchen in einem Glasröhrchen mit feucht zu haltenden Fließpapierstreifen zur Eiablage darauf veranlaßt werden; sollten sie hier zu dicht liegen, so schwemmt man sie mit Wasser auseinander; sie liegen dann so wie auf der Wasseroberfläche. Das ausgeschnittene Stück Fließpapier mit den Eiern wird zu deren Abtötung und Fixierung etwas über der Spiritusflamme erwärmt, dann ein Deckgläschen mit Plastlinfüßchen aufgesetzt und das Präparat mit KRÖNIGSchem Lack luftdicht abgeschlossen; die Feuchtigkeit des Fließpapiers muß erhalten bleiben, um Schrumpfen der Eier zu vermeiden. Die genannten Verfahren lassen sich auch im Feldlaboratorium leicht durchführen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Jessen-Marwedel, H., Die Glasschmelze mikroskopisch gesehen. Ein Beitrag zu ihrer Morphologie. Microscopical examination of glassmelting. A contribution to its morphology. La fusion du verre vue au microscope. Contribution à sa morphologie. Frankfurt/Main 1951 (Deutsche Glastechn. Gesellsch.). 151 S., 125 Abb. Preis geb. DM 10,—.

Das H. MAURACH und W. E. S. TURNER gewidmete Buch, Erweiterung eines Vortrages auf der 25. Glastechnischen Tagung im Mai 1951 in Frankfurt, stellt einen Atlas von vorzüglichen Mikrophotogrammen aus dem Bereich der Glas-

schmelze dar, mit dreisprachiger Erklärung versehen. Einleitend werden die Anfänge der Mikroskopie des Glases behandelt und die heutige Bedeutung des Mikroskopes auf diesem Gebiete; es soll in einem Laboratorium mit vorwiegend betrieblich ausgerichteten Aufgaben neben anderen Untersuchungsverfahren zu Rate gezogen werden und gibt dann wertvolle Aufschlüsse hinsichtlich vieler Störungserscheinungen der Glasschmelze; das wird in überzeugender Weise an den Abbildungen vorgeführt. Diese beginnen mit der Prüfung des Rohmaterials, des Glasschmelzsandes, und gehen dann über zur Darstellung von Zuständen im Fortschritt der Schmelze, wie der Blasenbildung, der Auflösung der Sandkörner, der sich verzögernden Auflösung von Fremdkörpern („Steinchen“). Ein weiterer Abschnitt behandelt die verschiedenen Arten von Schlieren, die merkwürdigen Zellenbildungen in der Schmelze, die Bewahrung von Grenzflächen von Schmelzraumbestandteilen. Weitere Abschnitte betreffen die Oberfläche der Glasschmelze, die Blasen im Glas, oft mit Schliermänteln, die „Knoten“, glasige Einschlüsse mit mehr oder weniger selbständiger Abgrenzung von abweichender chemischer Beschaffenheit, Fremdkörper wie Tonerdefäden und dgl. mehr. Dann folgt die Darstellung des feuerfesten Materials. Weiter werden geschildert die „Galle“-Tropfen auf der Schmelzoberfläche nach ihrer Erstarrung, die durch Überschuß von Natriumsulfat bzw. mangelhafte Reduktion desselben entstehen, die Salzblasen mit meist rhythmischen Niederschlagsbildungen und schließlich die Entglasung. Diese Morphologie des Glases geht nicht nur den Glastechniker an, sondern wird bei jedem Naturwissenschaftler Interesse finden; nicht zuletzt bei dem Mikroskopiker.

W. J. Schmidt (Gießen)

Bancher, E. Mikrurgische Studien an Delphinium-Anthocyano-phoren (Protopl. Bd. 40, 1951, S. 194—200).

Die gefärbten Inhaltskörper, welche Verf. in den Kelchblättern von Delphinium fand, bestehen offenbar aus Anthozyan und einem farblosen Grundkörper, an welchen der Farbstoff nicht fest gebunden zu sein scheint, sondern welchen er nur durchtränkt, so daß dieser schon durch Wasser ausgewaschen werden kann.

Küster (Gießen)

Stiegler, A. Vitalfärbungen an Pflanzenzellen mit Cresylechtviolett (Protopl. Bd. 39, 1950, S. 492—506).

Cresylechtviolett färbt reine Zellulosewände oberhalb des Entladungspunktes elektroadsorptiv rosa, Ligninwände violettblau, bei niedrigem pH (um 2) stahlblau; $CaCl_2$ vermag diese Färbung nur unvollkommen oder garnicht auszuwaschen; sie beruht also nicht auf Ionenadsorption. An den Membranen der Trichome vieler Pflanzen sind den Autoren nach Vitalfärbung schon mehrfach beachtenswerte Differenzierungen aufgefallen; Verf. verweist insbesondere auf die Membranen der Basalzellen und Basalplatten mehrzelliger Haare (*Ballota nigra* u. a.), die sich elektiv dunkelviolett färben.

Küster (Gießen)

Sobels, J. C., u. van der Brugge, H. F. J., Influence of daylight on the fruiting of tow orange-yellow pigmented Myxomycete plasmodia (Proc. Kon. Nederlandse Akad. v. Wetensch. Vol. 53, Nr. 10, 1950, S. 1610 bis 1616).

Die Verf. beschreiben eine Methode, Plasmodien von Myxomyceten besonders typisch auf Blumentöpfen zu kultivieren (*Physarum polycephalum* u. a.).

Küster (Gießen)

Pardatscher, G., Protoplasmatische Studien an Blütenzellen von *Dahlia* (Portugaliae Acta biolog. Sér. A. vol. 3 No. 2 p. 171—186, 1951).

Erzeugung von Vakuolenkontraktion an den Blüten von *Dahlia* durch Entlüftung der Korollenblätter; Beobachtung von „Plasmatentakela“.

Küster (Gießen)

Cholnoky, B. v., u. Höfler, K., Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen (Sitz.-Ber. Österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 159, H. 6—10, S. 143—182 mit 23 Text-Abb.).

Die Verff. behandeln vorzugsweise die Lebendfärbung von *Microspora* und *Oedogonium*, von *Zygnematazeen*, *Desmidiaceen*, einigen *Protococcaceen*, *Tetrasporazeen*, *Heterokonten* und *Diatomeen*. Besonders eingehend werden die mit Neutralrot, Methylenblau und anderen basischen Farbstoffen erzielbaren Färbungen beschrieben, über deren zeitlichen Verlauf die Verff. eingehende Angaben zusammenstellen. Farbstoffspeicherung im Zellsaft kommt in der Weise zustande, daß Moleküle der basischen Farbstoffe aus alkalischer oder neutraler Lösung durch das Protoplasma in den schwach sauren Zellsaft einwandern und in diesen zu Ionen dissoziiert werden; letztere können infolge ihrer Lipoidunlöslichkeit nicht wieder durch das Plasma abwandern. Ionenfärbung kann auch in speicherstofffreien Zellsäften erfolgen, — also auch dann, wenn speichernde, mit der zugeführten Farbe chemisch reagierende Stoffe dem Zellsaft fehlen. — Die Verff. sprechen eingehend von der durch Vitalfärbung hervorgerufenen Vakuolenkontraktion und Vakuolenzerschnürung. Der zwischen Vakuole und Zellwand liegende Raum wird bei den Algen indessen nicht ausschließlich (wie bei *Drosera*) von gequollenen Plasma erfüllt; vielmehr lösen sich die Vakuolenwände vom Plasmawandbelag und farblose Flüssigkeit füllt den zwischen beiden liegenden Raum; man muß annehmen, „daß der Raum außen, der farblose Flüssigkeit führt, abfiltrierten Zellsaft enthält; für gewisse von den osmotisch wirksamen Vakuolenstoffen müssen also die sich kontrahierenden Tonoplasten permeabel sein“. — Wenn in saurem und alkalischem Farbstoffbade verschiedene Färbungsergebnisse sich bemerkbar machen, so handelt es sich bei der Membranfärbung um eine Elektroadsorption der Farbstoffkationen an der negativ aufgeladenen Zellulosewandung; sie reicht nach der sauren Seite bis zum Entladungspunkt, dem IEP der Zellulose; Farbkationen vermögen nicht in das Zelleninnere einzudringen; — sind im Übergangsbereich Ionen und Moleküle im Farbbad nebeneinander vorhanden, so kann grundsätzlich sowohl Membranadsorption als auch Vitalfärbung des Protoplasmas folgen; über die Art der Färbung entscheidet die Speicherkonkurrenz der Zellenteile. Bei Akridinorange (HÖFLER 1948) ist die Zellsaftspeicherung durch chemische Bindung besser als die Elektroadsorption der Membran, letztere aber stärker als die Ionenspeicherung in „leeren“, d. h. speicherstofffreien Zellsäften.

Küster (Gießen)

Kenda, G., u. Weber, F., Die Membran der Bromeliaceen-Schließzellen (Phyton Bd. 3 (1951) S. 227—230).

Die Membran der Epidermiszellen der Bromeliaceen färben sich in Millons Reagens rot (Eiweißgehalt? Tyrosingehalt?); in der Membran der Schließzellen bleibt diese Reaktion aus.

Küster (Gießen)

Dimond, A. E., Stoddard, E. M., u. Rich, S., The effect of dyes in retarding the development of crown galls (Phytopathology Vol. 41 (1951) S. 911—914).

Farben, auch solche, welche in der mikroskopischen Technik ihre Rolle spielen, sind schon wiederholt auf die Wirkung untersucht worden, die sie auf den crown

-Organismus haben; nachdem (L. G. NIKKEL, Botan. Gaz. Vol. **112** 1951 290) Wirkung der Farben auf bereits entwickelte Gallen geprüft hat, injizieren die f. die Farblösungen in ihre Objekte (Tomate) 1–2 Tage vor der Bakterieninfektion (Methylenblau, Rodamin B, Brillantgrün, Malachitgrün, Eosin B, Chloranil-Rot u. a.). Die Größe der Gallen bleibt infolge der Farbstoffbehandlung hinter der der unbehandelten Objekte zurück. Selbst Farben von ähnlichen chemischen Charakteren wirken auf das Gallenwachstum verschieden.

Küster (Gießen)

ber, F., Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis* (Phyton Bd. 3 1951, S. 274–275).

Eiweißspindeln werden in *Epiphyllum* und *Rhipsalis* gefunden; bei Behandlung mit Jod-Jodkalium erfahren sie mannigfaltige Deformationen, bei welchen sie als korkzieherartige Gestalt annehmen. Mit dieser gleichen sie den von KLEBAHN in den Zellen viruskranker Pflanzen gefundenen „Trypanoplasten“; dieselben Deformationen ruft FLEMMINGS Fixierungsmittel hervor; vermutlich auch die von KLEBAHN wahrgenommenen Formen ein Produkt der Fixierungsmittel. Verf. beschreibt die Abkuglung der Spindeln, die man unter dem Einfluß beider genannten Mittel beobachten kann; andererseits sieht man sie bei langsamer Einwirkung von Jod-Jodkalium fest und spröde werden und zerbrechen.

Küster (Gießen)

hulze, H. L., Neue Ergebnisse über den Bau und die Teilung des Zellkernes bei Hefen (Naturw. Rundschau 1951, S. 152–154).

Verf. erläutert die Schwierigkeiten, welche einer befriedigenden Färbung des Zellkerns bei Untersuchung der Hefezellen im Wege stehen; die FEULGENsche Reaktionsreaktion zeigt bei sorgfältiger Anwendung regelmäßig ein typisch gebildetes, linsen- oder uhrglasförmiges Gebilde, das als Kern angesprochen werden kann. Verf. verweist auf die von LIETZ (Diss. Techn. Hochschule München 1950 noch nicht veröffentlicht) angewandte Methode; sie zeigt die chromatische Substanz als gewölbte Scheibe einer Wandseite angelagert. Die Schwierigkeiten, welche die Untersucher der Hefezelle zu spüren bekommen haben, liegen nach Verf. darin, daß bei der Sprossung und Teilung der Zellen der Tochterkern eine rasche Passage zur Tochterzelle zurückzulegen hat; die Lage des sich teilenden Zellkerns wechselt; die Bilder werden schwierig zu deuten sein, wenn er dicht vor dem Zellkanal liegt und dort seine Teilung durchmacht. Gute Kernteilungsbilder lieferte LIETZ an *Zygosaccharomyces Priorianus*.

Küster (Gießen)

fler, K., Fluorochromfärbung an lebenden Protoplasten (Mikrochemie 1951 Bd. 36/37, S. 1146–1157).

Von dem reichen Inhalt der Arbeit verweisen wir auf die Angaben über Speicherkonzentration: Wenn sogenannte „volle“ Zellsäfte die zugeführten Vitalfarbstoffe speichern, dann bleibt offenbar für das Protoplasma nichts übrig, weil die Affinität der Zellsaftspeicherstoffe zur Farbe größer als die des letzteren ist; sind aber die Zellsäfte „leer“, d. h. von Speicherstoffen frei, so färbt sich das Protoplasma intensiv an (Rhodamin B) — bei dem elektroneutralen Farbstoff fällt die Speicherkonzentration der Zellmembranen auf. — Rhodamin B wird nach STRUGGER von Rhodospirillum vital gespeichert; verschiedene Algen speichern den Farbstoff in ihren Zellsäften verschieden energisch — *Netrium* stets sehr stark, *Micrasterias* schwach. Zellkerne färben sich mit Akridinorange rot oder grün (UV-Licht); die Rot-

färbung toter Zellenkerne beruht auf elektroadsorptiver Speicherung, die Grünfluoreszenz toter oder lebendiger Kerne auf chemischer Farbbindung. — Molekulare Farbstoffe permeieren das lebendige Protoplasma leicht und durchdringen den ganzen Protoplasten „widerstandslos“ und werden dort gespeichert, wo stärkste Affinität vorliegt; ionisierte Farbstoffe — da sie nur wasser-, aber nicht lipoidlöslich sind, können nicht den lebendigen Protoplasten durchwandern, sondern immer nur die außerhalb der semipermeablen Schicht liegenden Wände färben — entweder elektroadsorptiv oder durch chemische Niederschlagsfärbung. Coriophosphin, ein ausgezeichnete metachromatischer Fluoreszenz-Farbstoff, wird von den Zellwänden bevorzugt gespeichert; behandelt man gefärbte Präparate mit Natriumkarbonat, so wird die Farbe aus den Membranen ausgetrieben, und es kommt zur Tonoplasten-Plasmolyse; in den isolierten Vakuolen macht sich Ionenspeicherung mit roter Fluoreszenzfarbe bemerkbar. Küster (Gießen)

Drawert, H., Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen (Protoplasten). Bd. 40, H. 1, 1951, S. 85—104).

Die mit zahlreichen Farbstoffen neuerdings gewonnenen Erfahrungen bestätigen die Regel, nach welcher „schwach dissoziierte und auch im stärker sauren Bereich gut lipoidlösliche basische Farbstoffe sich vorwiegend als Kern- und Plasmafärbemittel eignen, während die stärker dissoziierten und nur im alkalischen Bereich gut lipoidlöslichen basischen Farbstoffe gute Membranfärber sind und unter geeigneten Bedingungen besonders in der Vakuole gespeichert werden. Dementsprechend erhält man bei den sauren Farbstoffen auch nur mit den schwächer dissoziierten im sauren Bereich gut lipoidlöslichen Vertretern vitale Kern- und Plasmafärbungen. Die stark dissoziierten, nicht lipoidlöslichen Vertreter werden dagegen nur vom Zellsaft bestimmter Zellsorten (Blumenblätter) aufgenommen.“ Küster (Gießen)

Subramaniam, M. K., Tetraploidy in yeasts (Cellule t. 54 fasc. 2, 1951, S. 143—148, av. 1 pl.).

Kerne und Mitosen, die den embryonalen Zellen der höheren Pflanzen entsprechen, zeigen nur die aerob herangewachsenen Hefezellenproben; die gärenden ähneln den Sekretzellen. Färbung der Kerne gelingt nach einstündiger Fixierung (Carnoy) und nach Färbung mit HEIDENHAINs Eisenalaun-Haematoxylin oder nach FEULGEN (Osmiumsäuredämpfe 20 Min., Hydrolyse 6 Min.). Zugabe einiger Acenaphthen-Kristalle zur Würze ruft mancherlei Abweichungen der Kernteilung hervor; Zellen mit doppelter Chromosomen-Ausstattung sind häufig.

Küster (Gießen)

Berichtigung zu Bd. 60, Heft 8, S. 509:

Der Preis des Büchleins von K. Zeiger, „Histologie. Grundzüge einer Vorlesung“, Hamburg (Richard Hermes 1948) ist schon seit drei Jahren auf DM 1,80 herabgesetzt.

Kleine Original-Mitteilungen

Kvam, Dr. Thorvald, Trondheim, Norwegen. — Eine weitere Modifikation der PASINischen Methode für Studien der Zahnentwicklung. — Eingegangen am 8. XII. 1951.

Beim Studium des Bindegewebes wünscht man oft drei Bestandteile durch Färbemethoden zu trennen: Retikulumfasern, kollagene Fasern und Cytoplasma. Für die Untersuchung der Entwicklung der speziellen Form des Zahnbeines, die ich „mesodermalen Schmelz“ genannt habe, und die wir u. a. bei Fischen finden [1], ist die Trennung dieser drei Gewebsbestandteile von besonderer Bedeutung.

Mit den Färbemethoden zum Nachweis der Fasern in den ersten Stadien der Entwicklung des mesodermalen Schmelzes hatte ich die besten Erfolge nach sublimathaltigen Fixierungsflüssigkeiten. Unter diesen fand ich MAXIMOWS Zenker-Formol am zuverlässigsten.

Die Retikulumfasern, die erste Stufe in der Entwicklung der kollagenen Fasern, auch im mesodermalen Schmelz, können von diesen dadurch gesondert werden, daß sie durch ammoniakalisches Silbernitrat färbbar sind, während die kollagenen Fasern durch diese Methode nicht beeinflußt werden. Die Behandlung der Schnitte mit ammoniakalischem Silbernitrat ist deshalb ein wichtiges Hilfsmittel, wenn man die Entwicklung des mesodermalen Schmelzes studieren will. An meinem Material hat WILDERS Silberimprägnierungsmethode [3] sehr gute Resultate gegeben, und sie hat auch den Vorteil, daß sie verhältnismäßig einfach durchzuführen ist.

Die zwei anderen oben erwähnten Gewebsbestandteile, kollagene Fasern und Cytoplasma, und die Veränderungen, die bisweilen darin während der Entwicklung des mesodermalen Schmelzes auftreten, studierte ich mit dem besten Erfolge an Schnitten, die mit einer Modifikation der PASINischen Methode gefärbt waren.

WALTER [2] hat früher PASINIs Methode modifiziert, um eine möglichst scharfe Trennung zwischen kollagenen Bindegewebsfasern und Cytoplasma zu bekommen. WALTERs Modifikation besteht in einer Beizung mit 2½% Eisenalaunlösung, während PASINI mit 2% Phosphorwolframsäure beizte. WALTER arbeitete mit 3µ dünnen Schnitten und fand dann, daß er die besten Resultate bekam, wenn er in 24 Stunden beizte und danach 24 Stunden lang mit der unverdünnten PASINischen Mischung färbte. Für 5—7µ-Schnitte empfahl er ½ bis 1 Stunde zu beizen und danach in 5 bis 10 Minuten zu färben.

Der Vorteil dieser Methode ist, daß man eine sehr distinkte Trennung von blaugefärbten Bindegewebsfasern und rotgefärbten Zellen und Zellausläufern bekommt. Wo diese Trennung besonders wichtig ist, fand ich die Methode besser als viele von den meist angewandten Bindegewebsfarben, z. B. Azan. Sie ist nicht brauchbar für sehr dicke Schnitte wegen der Intensität der Farben. Die Farben vertragen sehr kräftige Beleuchtung beim Studium der Präparate im Mikroskop; in geeigneten Schnitten ist es deshalb leicht, die Strukturen des Gewebes zu trennen.

Ich machte viele Experimente, die Zusammensetzung und die Stärke des Farbgemisches, und die Zeitdauer des Färbens zu variieren. Das Beizen mit 2½%igem Eisenalaun wurde von 2 bis 24 Stunden variiert ohne sichtbaren Unterschied in die Wirkung des Färbens.

Die PASINische Mischung besteht aus einer blauen Komponente, repräsentiert durch Unnas Farbe, und einer roten Komponente, repräsentiert durch Eosin

und Säurefuchsin. Nach sehr kurzer Zeit färbt sich der ganze Schnitt rot. Mit fortschreitender Zeit wird die blaue Farbe allmählich mehr und mehr dominierend, und wenn man das Färben genügend lange fortsetzt, wird der ganze Schnitt blau. Mit meinem Material lieferte 24stündige Färbung, die WALTER empfiehlt, vollständig blaue Schnitte. Es zeigt sich somit, daß die rote Komponente zuerst wirkt, während die blaue langsamer zur Geltung kommt, aber die blaue Komponente verdrängt allmählich die rote und herrscht zuletzt allein.

Die Versuche ergeben, daß für meine ungefähr 6μ dicken Schnitte ratsam war ein Farbungemisch anzuwenden, worin Blau ein wenig mehr dominierte als in der PASINISCHEN Mischung. Ich fand zuletzt, daß sowohl die rote als die blaue Komponente maximale Stärke bekamen, wenn die folgende Mischung eine Stunde lang wirkte:

PASINI	1 Teil
Unna	1 Teil
Aqua dest.	40 Teile

Wenn sowohl die rote als die blaue Farbe am intensivsten hervortreten, besteht der ausgesprochenste Unterschied zwischen rotgefärbten Zellen und blaugefärbten Bindegewebsfasern.

Bei der Entwicklung der organischen Grundlage des „mesodermalen Schmelzes“ der Selachier sammelt sich das Cytoplasma der peripherischen Zellen der Zahnpapille in der Spitze der Zahnpapille, und die Fibrogliafibrillen im Cytoplasma werden allmählich in kollagene Fibrillen umgewandelt [1]. Zur Demonstration dieser Umwandlung war die beschriebene Färbemethode besonders instruktiv.

Schrifttum

1. KVAM, T.: The Development of Mesodermal Enamel on Piscine Teeth. — Det kgl. norske videnskabers selskab, Trondheim (1950).
2. WALTER, L.: Neuartige Anwendung des Pasinischen Farbungemisches für feinere Untersuchung des Bindegewebes. — Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. **46**, 457 (1929).
3. WILDER, H. C.: An Improved Technique for Silver Impregnation of Reticulum Fibers. — Amer. Journ. Path. **11**, 817 (1935).

Petry, Gerhard Über die Färbung elastischer Fasern mit Haematoxylin. (Aus dem Anatomischen Institut der Universität Freiburg i. Br. Direktor: Prof. Dr. K. GOERTTLER). — Mit 1 Abbildung. — Eingegangen am 15. XII. 1951.

Die elastische Faser kann mit Phosphormolybdänsäure in einen Fixationszustand gebracht werden, der eine nachträgliche Längenänderung ausschließt (PETRY 1951). Bei der Prüfung der Färbbarkeit derartig fixierter Objekte wurden Flachschnitte aus einer gedehnt mit Phosphormolybdänsäure fixierten Aortenwand mit den üblichen Färbemethoden behandelt. Dabei ergab sich bei der Färbung mit Haematoxylin, daß außer den Kernen die elastischen Fasern und die gefensterten Membranen leuchtend blau und bis in die feinsten Elemente scharf dargestellt wurden (Abb. 1). Die übrigen Gewebsbestandteile färbten sich nicht an. Die Verweildauer in Haematoxylin betrug 10–15 Min. Differenziert wurde kurz in Salzsäurealkohol. Daran anschließend wurde wie üblich gewässert. Bei längerer Einwirkung des Salzsäurealkohols hielt sich das Haematoxylin am hartnäckigsten in den elastischen Fasern.

Unter Berücksichtigung der als spezifisch zu bezeichnenden Wirkung der Phosphormolybdänsäure auf das Elastin und der darauf sich einstellenden elektiven Färbung des Elastins durch Haematoxylin kann diese Färbung als eine Beizen-

färbung angesprochen werden. Die Phosphormolybdänsäure stellt hierbei die für die Vorbehandlung des Elastins erforderliche Beize dar. Erst nach der Beizenwirkung färbt Haematoxylin wahrscheinlich unter Bildung eines Farblackes die elastische Faser an, was ohne diese Vorbehandlung niemals der Fall ist.

Es werden in der histologischen Technik in der Hauptsache zwei Farbstoffe zur elektiven Färbung des Elastins benutzt:

Resorcin-Fuchsin und Orcein. Zahlreiche Untersuchungen liegen vor, die sich mit der Färbung des Elastins befassen. Vielfach wurden z. B. durch Änderung bestimmter Anteile des „WEIGERT“-schen Farbstoffes (Eisenchlorid, Resorcin-Fuchsin oder Fuchsin) Farbstoffe angegeben (MICHAELIS, zit. bei ZEIGER, 1938), die mehr oder weniger in salzsaurer alkoholischer Lösung elastische Fasern elektiv darstellen. Augenscheinlich haben sich diese Methoden nicht durchgesetzt. Haematoxylin wurde in Verbindung mit der Phosphormolybdänsäure nach MALLORY (siehe ROMEIS § 1913) insofern schon verwendet, als beide Substanzen zu einer Farblösung zusammengebracht wurden. Diese Lösung färbt das kollagene Bindegewebe tief blau. Im Gegensatz zur Methode nach MALLORY verwende ich die Phosphormolybdänsäure (1%ige wässrige Lösung) nur als Fixierungsmittel des Elastins. Wahrscheinlich wird die Phosphormolybdänsäure dabei sehr stark oder zumindest stärker als an allen anderen Gewebsbestandteilen am Elastinmolekül gebunden. Die für das Molybdän charakteristische blaue Farbe tritt durch die Reaktion des Haematoxylins naturgemäß dort am stärksten auf, wo die Phosphormolybdänsäure auch am stärksten vertreten ist. Dies ist im Elastin der Fall! Bei der von MALLORY für kollagenes Bindegewebe angegebenen Färbung mit Molybdän-Haematoxylin kann die vorausgehende Fixierung mit „Zenker“ als eine Beizung für Kollagen betrachtet werden.

Die physikalischen Eigenschaften des Elastins waren nun, wie früher gezeigt wurde (PETRY 1951) durch das ZENKERSche Gemisch kaum verändert. Die Dehnbarkeit des Elastins bleibt hierbei erhalten, woraus zumindest der Schluß gezogen werden kann, daß keine erheblichen Bindungen zwischen den zur Fixierung benutzten Agenzien und dem Elastin auftreten. Vielleicht ist dies ein Grund, weshalb auch Elastin bei MALLORY nicht durch Haematoxylin angefärbt wird.



Abb. 1. Elastische Fasern und Platten aus einem Flachschnitt Aortenwand (Rind). Fixierung: 1%ige wäss. Phosphormolybdänsäure. Färbung: Haematoxylin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Phosphormolybdänsäure neben ihrer spezifischen, die Dehnbarkeit des Elastins aufhebenden Wirkung noch die Wirkung einer Beize hat, nach der Haematoxylin gegen seine sonstige Gewohnheit, das Elastin elektiv darzustellen vermag.

Schrifttum

- 1) MICHAELIS: (zit. bei ZEIGER).
- 2) PETRY, G.: Z. f. Zellforschung Bd. 36, H. 4 (1951).
- 3) ROMEIS, B.: Taschenbuch der mikr. Technik. 15. Auflage (1948).
- 4) ZEIGER, K.: Physiko-chemische Grundlagen der histologischen Methodik (1948).

Hirsch, Th. von. Histologische Schnitte im Phasenkontrastbild. (Institut für Serologie und experimentelle Therapie an der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie in München, Max-Planck-Institut.) Mit 3 Abbildungen. — Eingegangen am 23. I. 1952.

Die Darstellbarkeit einer ungefärbten Struktur im Phasenkontrastmikroskop ist an die Voraussetzung geknüpft, daß zwischen den einzelnen Strukturelementen Unterschiede im Brechungsindex bestehen. Diese Unterschiede müssen auch von geeigneter Größenordnung sein, um ein kontrastreiches objektähnliches Bild zu geben. Bei zu kleinen oder zu großen Unterschieden geht der Kontrast oder die Objektähnlichkeit verloren.

Für die Darstellung von Gewebeschnitten ist nun zu berücksichtigen, daß das frische Gewebe einen bedeutenden Wassergehalt hat und daß im fertigen mikroskopischen Präparat dieses Wasser entfernt worden und an seine Stelle das Einschlußmedium getreten ist. Das Einschlußmedium schließt den Schnitt nicht nur äußerlich ein, sondern erfüllt auch alle submikroskopischen Hohlräume im Gewebe, welche durch die Entwässerung entstanden sind. Jedes einzelne mikroskopisch auflösbare Strukturelement ist also in Wirklichkeit nicht optisch homogen, sondern besteht aus einer submikroskopischen Struktur, deren Bestandteile die wasserfreie Gewebesubstanz mit dem Brechungsindex n_S und das Einschlußmedium mit dem Brechungsindex n_E sind. Wenn wir den Volumenanteil der wasserfreien Gewebesubstanz mit p bezeichnen, so wird der wirksame Brechungsindex eines mikroskopisch auflösbaren Strukturelementes gegeben sein durch¹⁾

$$n = p \cdot n_S + (1 - p) \cdot n_E$$

Der Unterschied im Brechungsindex von zwei verschiedenen Strukturelementen beträgt somit

$$n_1 - n_2 = p_1 \cdot n_{S1} - p_2 \cdot n_{S2} - (p_1 - p_2) \cdot n_E$$

Die Bedeutung dieser Gleichung wird sofort klar, wenn wir zwei extreme Grenzfälle betrachten:

1. Für $p_1 = p_2$ wird $n_1 - n_2 = p \cdot (n_{S1} - n_{S2})$, d. h. die Größe von $n_1 - n_2$ und damit die Beschaffenheit des Phasenkontrastbildes wird durch die Wahl von n_E überhaupt nicht beeinflusst.
2. Für $n_{S1} = n_{S2}$ wird $n_1 - n_2 = (p_1 - p_2) \cdot (n_S - n_E)$, d. h. die Größe von $n_1 - n_2$ ist proportional zu $p_1 - p_2$ und sie kann außerdem durch geeignete Wahl von n_E auf die für die Phasenkontrastdarstellung optimale Größenordnung gebracht werden.

Auf Grund dieser einfachen theoretischen Überlegungen wurden systematische Versuche mit verschiedenartigen Gewebeschnitten gemacht unter Verwendung von

¹⁾ Streng genommen darf man nicht die Brechungsindices, sondern nur die Refraktionen additiv zusammensetzen. Solange aber der Unterschied zwischen n_S und n_E nicht groß ist, gibt obige Näherungsformel einen vernachlässigbar kleinen Fehler.

Einschlußmedien, deren Brechungsindex von 1,33 bis 1,70 in Schritten von einer Einheit der zweiten Dezimale variiert wurde. Das Ergebnis war in großen Zügen sehr einheitlich. Es gibt jeweils einen Wert von n_E , der bei etwa 1,55 liegt (mit Einheit der zweiten Dezimale), bei welchem das Phasenkontrastbild so flau ist, daß die Strukturen praktisch nicht zu erkennen sind. Hier ist also n_E dem mittleren n_S der einzelnen Strukturelemente soweit wie möglich angeglichen und der Versuch zeigt, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen n_S -Werten im allgemeinen nicht groß genug sind, um ein brauchbares Phasenkontrastbild entstehen zu lassen.

Schon wenn n_E von diesem Wert nur um wenige Einheiten der zweiten Dezimale abweicht, erhält man gute kontrastreiche Bilder. Je nachdem ob n_E kleiner oder

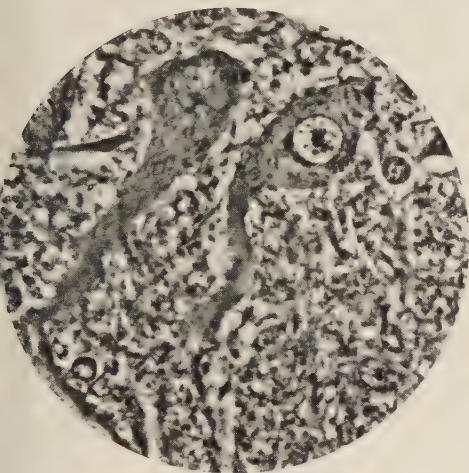


Abb. 1

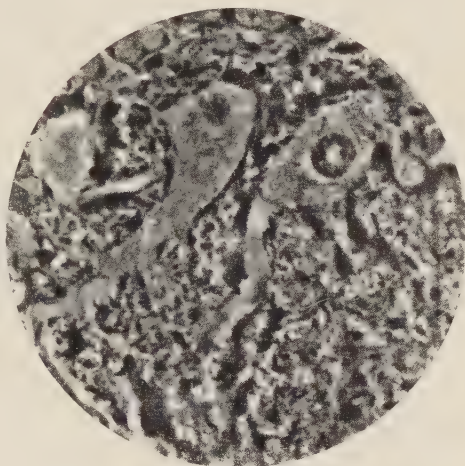


Abb. 2

Abb. 1. Kaninchen, Kleinhirn, Paraffinschnitt 5μ , Phasenkontrastbild, Obj. 40/0,63, Vergr. 600, n_E 1,49.

Zwei große Nervenzellen (Purkinjezellen) mit langem Dendriten. Bei der rechten Zelle sieht man den Zellkern als helle kreisförmige Scheibe mit dem schwarzen Kernkörperchen in der Mitte. Weil n_E kleiner als n_S ist ($n_S = 1,55$) erscheint die Struktur dunkel auf hellem Grunde.

Abb. 2. Phasenkontrastbild derselben Stelle wie Abb. 1, aber mit $n_E = 1,60$. Weil n_E größer als n_S ist, erscheint die Struktur hell auf dunklem Grunde.

größer als n_S ist, erscheinen dabei Strukturelemente mit größerem Volumenanteil an wasserfreier Gewebesubstanz dunkler oder heller als die Umgebung (vgl. Abb. 1 und 2). Mit zunehmendem Absolutwert von $n_E - n_S$ nimmt der Bildkontrast anfangs zu, erreicht aber schon etwa bei $n_E - n_S = 0,05$ seinen größten Wert und bleibt weiterhin ziemlich konstant. Ab etwa $n_E - n_S = 0,10$ wird das Bild ohne an Kontrast zu verlieren weniger klar und die Objektähnlichkeit nimmt, wie bei größeren Gangunterschieden theoretisch zu erwarten ist, allmählich ab (vgl. Abb. 3). Diese letztere Erscheinung wird allerdings je nach der Art des Objektes oft erst bei recht großen Differenzen zwischen n_E und n_S deutlich erkennbar.

Es zeigt sich also, daß man bei geeigneter Wahl des Einschlußmediums die Struktur von Gewebeschnitten im Phasenkontrastmikroskop sehr gut darstellen kann

und daß die Bilder, insbesondere für n_E kleiner n_S , mit der Darstellung durch nicht selektive Färbemethoden durchaus vergleichbar sind. Aus dem beschriebenen Verhalten ist ersichtlich, daß man sich bei Gewebeschnitten im allgemeinen ziemlich nahe an dem oben diskutierten Grenzfall 2 befindet. Das heißt mit anderen Worten: Im Phasenkontrastbild kommt in erster Linie der in den einzelnen Strukturelementen verschiedene Volumenanteil an wasserfreier Gewebesubstanz zur Darstellung, während die meist sehr kleinen Unterschiede in Brechungsindex der wasserfreien Gewebesubstanz nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dasselbe gilt für die Darstellung durch nicht selektive Färbemethoden, wo auch die Stellen am intensivsten gefärbt sind, an welchen die Konzentration der anfärbbaren Substanz am größten ist.

Wenn allerdings im Brechungsindex der wasserfreien Gewebesubstanz größere Unterschiede auftreten, werden sie sich selbstverständlich auf das Phasenkontrastbild auswirken und es wird in diesem Falle die Möglichkeit bestehen, durch geeignete Wahl von n_E gewisse Strukturelemente besonders hervortreten zu lassen, ähnlich wie bei selektiven Färbemethoden.

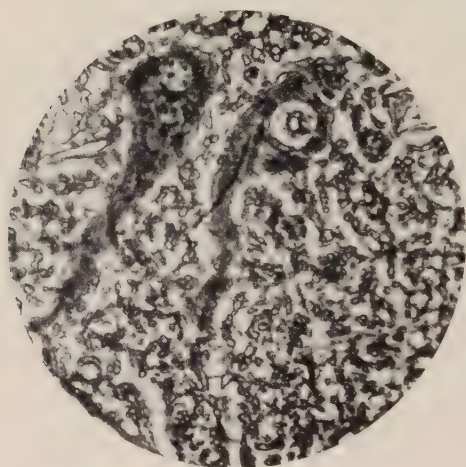


Abb. 3. Phasenkontrastbild derselben Stelle wie Abb. 1, aber mit $n_E = 1,33$. n_E ist viel kleiner als n_S . Die Struktur erscheint wie bei Abb. 1 dunkel auf hellem Grunde, aber die dunklen Teile sind in der Mitte aufgehellt, so daß oft nur mehr die Umrandungslinie dunkel ist, während das Innere hell erscheint (sehr deutlich zu sehen am Kernkörperchen). Diese Erscheinung rührt daher, daß infolge der großen Differenz zwischen n_E und n_S der optische Gangunterschied zu groß ist und wird durch die Theorie des Phasenkontrastverfahrens erklärt. Das Bild ist zwar kontrastreich, aber nicht mehr objektähnlich.

Es ist anzunehmen, daß die Phasenkontrastmethode auch in der Histologie und Histopathologie neben den bewährten Färbemethoden mit Vorteil anwendbar ist, insbesondere zur Darstellung von Strukturen, welche nicht anfärbbar sind oder infolge einer pathologischen Veränderung ihre Anfärbbarkeit verloren haben. Untersuchungen in dieser Richtung sind zur Zeit im Gange.

Die vorliegende Arbeit wurde durch das großzügige Entgegenkommen von Herrn Prof. F. JAHNEL ermöglicht. Meinen besonderen Dank möchte ich auch Frl. Dr. F. PRUCKNER für ihre Anregung und Förderung aussprechen.

Küster, Ernst Über Vitalfärbung der Pflanzenzellen VI¹⁾. Vitalfärbungen mit Haematoxylin. (Botan. Institut Gießen). — Eingegangen am 18. II. 1952.

Haematoxylin, das bei den mit fixiertem Material arbeitenden Zellen- und Zellkernmorphologen seit Jahrzehnten als wichtiges Färbemittel in hohem Ansehen steht, vermag auch lebendige Zellen zu färben.

¹⁾ Vgl. I in Ztschr. f. wiss. Mikrosk. 1918 Bd. 35 S. 95; II, III u. IV in Ztschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. 38 (1921) S. 280; und in Ztschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. 43 (1926) S. 378.

Ich verwendete Lösungen des Farbstoffes in Leitungswasser oder in 0,4%iger Sodalösung; auch stärkere Lösungen des letzteren wurden angewandt, sie wirkten indessen auf die Zellen der von mir gewählten Objekte so stark giftig, daß ich von ihrer Verwendung absehen und zu schwachen Sodalösungen oder Leitungswasser-Lösungen zurückgreifen mußte.

Ein besonders aufschlußreiches Objekt waren, wie bei so vielen ähnlichen Versuchen, die Zwiebeln von *Allium cepa*: ihre Sohlen wurden angeschnitten und die Zwiebeln mit ihrer Wunde in die Haematoxylin-Lösung gestellt — oder die Zwiebeln wurden mit äquatorial gerichteten Schnitten halbiert in die Lösung gebracht. Auf die zuletzt genannte Weise (Leitungswasser oder schwache Sodalösung) gelang es, kräftige Färbungen des Zellensaftes zu erzielen: Die Vakuolen nehmen einen schmutzig-violetten Ton an oder einen zwischen Braun und Violett liegenden Farbton, wenn die Farbe reichlich in die Zelle gedrungen ist; Zellen, welche von der Schnittfläche mehrere Zellenlagen weit entfernt liegen, zeigen einen schmutzig-gelblichen Ton. In diesen wie in jenen Fällen handelt es sich um Zellen, die noch am Leben sind und auf Zusatz von $n\text{-KNO}_3$ eine Plasmolyse geben, die in allen Punkten der Plasmolyse ungefärbter Zellen entspricht.

Auch bei Versuchen von 3—5-tägiger Dauer habe ich das Haematoxylin in den Leitbündeln nicht mehr als einige mm weit sich verbreiten sehen: In der Nähe der Wundfläche zeigen die Zellen der an den Sohlen angeschnittenen Zwiebeln eine rotviolette oder violettbraune Färbung; die Lumina der Gefäße sind mit farbigen Massen gefüllt und ähnliche findet man oftmals in den Interzellularräumen des Grundgewebes.

In den vorhin erwähnten äquatorial angeschnittenen Zwiebelschuppen sind in manchen Präparaten viele Zellen, deren Membranen sich bräunlich gefärbt haben, schon nach 24 Stunden tot; indessen finden sich neben den abgestorbenen nach gleicher Versuchsdauer auch noch lebende.

Das Protoplasma der gefärbten Zellen ist farblos; niemals sah ich, daß die Kerne sich vital mit Haematoxylin gefärbt hätten, während die der toten Zellen überall einen zarten rotvioletten Färbungston angenommen hatten. Bei Musterung der plasmolysierten Präparate muß es manchen Zellen gegenüber fraglich bleiben, ob das Protoplasma in ihnen noch am Leben ist oder ob vielleicht die Kontraktionsbilder nur von der (noch semipermeablen) Vakuolenwand geliefert werden.

In den mit Leitungswasser hergestellten Haematoxylinlösungen war der Erhaltungszustand der Zellen im allgemeinen besser als in schwachen Sodalösungen, die Haematoxylinfärbung der Vakuolen blieb in vielen Fällen allerdings sehr blaß.

In gleicher Weise wie die Zwiebelschuppen von *Allium* wurden zahlreiche andere Objekte untersucht, von welchen bekannt ist, daß ihre Zellen bzw. ihre Vakuolen auf dem Wege der Transpirationsmethode sich leicht färben lassen. Bei meinen Haematoxylinversuchen bewährte sich aber keines der Objekte so gut wie *Allium cepa*.

Küster, Ernst Über Vitalfärbungen der Pflanzenzellen VII. Vitalfärbungen mit Prontosil. (Botanisches Institut Gießen). — Eingegangen am 18. II. 1952.

Die von DRAWERT (1950; dort weitere Literaturangaben) veröffentlichten Mitteilungen über Prontosil als Vitalfärbemittel pflanzlicher Zellen haben mich veranlaßt, die vor einigen Jahren von mir angestellten Versuche zu wiederholen und die Verwendbarkeit des Prontosils als Vitalfärbemittel der Pflanzenzellen erneut zu prüfen.

Ich bediente mich der in Ampullen erhältlichen 5%igen Lösung: Selbst eine so hohe Konzentration darf zur Anwendung kommen; sie erweist sich manchen der von mir verwendeten Objekten gegenüber als wenig schädlich.

1. Die Epidermen von Zwiebelschuppen (*Allium cepa*) wurden in die unverdünnte Lösung eingetragen und nach 24 Stunden untersucht; Die Zellen der Konkavepidermen waren tot, die der Konvexepidermis noch am Leben, wie sich durch Plasmolyse zeigen ließ. Färbung zeigten die Zellen nicht, auch nach plasmolytischer Kontraktion (nKNO_3) ließ der Zellsaft keine Färbung erkennen. Nach weiteren 24 Stunden war der Befund derselbe.

Auffallend ist, daß in den Konvexepidermen zwischen den farblosen Stellen ganz vereinzelt solche liegen, deren Inhalt sich stark rubinrot gefärbt hat; auch diese Zellen sind plasmolysierbar; es entstehen Konkavplasmolyseformen; bei starkem Wasserverlust trennt sich die Vakuole bei fortgesetzter Kontraktion von dem Protoplasma, das seine weitere Kontraktion einstellt; die Vakuole ist leuchtend rot gefärbt. Es scheinen in diesen Zellen Stoffe vorhanden zu sein, welche den Prontosilfarbstoff speichern.

Verfährt man in der Weise, daß man Zwiebeln in die Farbstofflösung tauchen läßt, nachdem man vorher an ihrer Sohle eine dünne Gewebeplatte abgetragen hat, und gibt man auf diese Weise dem Farbstoff Gelegenheit in die Leitbündel einzudringen und in ihnen aufzusteigen, so tritt sehr bald deutliche Färbung ein; da nur an der Schnittfläche die Zwiebel benetzt ist, im übrigen aber von Luft umgeben wird, und da überdies die trockenen Schuppenanteile entfernt und die saftigen Gewebe der inneren Schuppen bloßgelegt worden sind, darf mit der Wirkung eines mäßig starken Transpirationsstromes gerechnet werden, der die Verbreitung der Farbstofflösung in den Gefäßen fördert. Nach 24 Stunden ist nicht nur an der Wundfläche starke Färbung wahrnehmbar, sondern selbst 1—2 cm über dieser hat sich die Nachbarschaft der Leitbündel stark gerötet, so daß breite rote meridional verlaufende Bänder auf der Zwiebel sichtbar werden. Unter dem Mikroskop zeigt sich, daß die unmittelbar an die Leitbündel grenzenden Grundgewebsmassen sehr stark, die in größerem Abstand von ihnen liegenden Zellen schwach gefärbt sind; alle farbigen Zellen sind normal plasmolysierbar (es wechseln Konkav- und Konvexformen). Selbst bei den äußersten Zellenreihen der gefärbten Zonen ist nach Plasmolyse die Färbung so stark, daß an der reichlichen Farbstoffaufnahme kein Zweifel bestehen kann. In 24stündigen Versuchen fand ich sehr deutliche Vitalfärbung selbst in einer Entfernung von 5—6 Zellenlagen von den Leitbündeln. Schnitte, die man von der Sohle der Zwiebel abhebt, zeigen dasselbe Bild: Um die quer geschnittenen jungen Wurzeln liegen breite Zonen englumiger Parenchymzellen mit stark gefärbtem Zellsaft.

Nach weiteren 24 Stunden ist die Überflutung der Gewebe mit dem roten Farbstoff sehr viel stärker geworden: Die Färbung der Zellen reicht von einem der meridional verlaufenden Leitbündel bis zu den nächsten. Sämtliche Grundgewebsschichten und zugleich die Epidermis sind gefärbt: Die Zellen der letzteren haben einen hell- oder dunkelrosenroten Ton angenommen; die Zellen des Grundgewebes sind erheblich stärker gefärbt und zeigen einen gelbroten Ton. Daß Epidermis und Grundgewebe der Zwiebelschuppen bei Vitalfärbung verschiedene Töne annehmen, ist für verschiedenartige Farben längst bekannt.

Die gefärbten Zellen sind durchweg plasmolysierbar.

Die Prontosillösungen haben eine sehr starke Färbekraft; selbst 0,5%ige Lösungen erscheinen noch bei einer Schichtendicke, die dem Durchmesser unserer *Allium*-Zellen entspricht, kräftig gefärbt. Die Färbung der Zellen entspricht nach Anwendung von 0,5% Lösungen ungefähr der mit 5% erzielbaren. Es liegt kein Grund vor anzunehmen, daß die Prontosilkonzentration der gefärbten Zellsäfte die der außen dargebotenen Lösung jemals übertrifft.

Auch stark verdünnte Lösungen (ein Tropfen Prontosil auf 120 ccm Wasser) weisen selbst noch bei einer Schichtendicke von 1 cm starke Rotfärbung auf. Zwiebeln, die mit einer angeschnittenen Sohle in solche Lösung gestellt werden, lassen selbst nach 6 Tagen noch keine Färbung der Leitbündel oder ihrer Nachbarschaft erkennen. —

Die an relativ starken Prontosillösungen wahrgenommenen Färbungsbefunde entsprechen durchaus den am gleichen und an vielen anderen Objekten mit sauren Anilinfarben (Fuchsin S usw.) leicht erzielbaren (vgl. KÜSTER 1911).

2. Stengel von *Impatiens Sultani* wurden in Prontosillösungen (0,5—5 %) gestellt. Nach 4 oder 5 Stunden nimmt man bereits eine starke Rötung der Leitbündel wahr; nach 24 Stunden erscheint das ganze durchscheinende Achsengewebe von dem roten Farbstoff überflutet.

Unter dem Mikroskop zeigt sich, daß die den Leitbündeln anliegenden Grundgewebszellen gelbrote Farbe in den Vakuolen aufzuweisen haben, und daß bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden kaum noch farblos gebliebene Gewebeanteile zu finden sind.

Die gefärbten Zellen sind plasmolysierbar (0,5 nKNO₃).

Das Färbungsbild entspricht dem mit sauren Anilinfarben erzielbaren — auch darin, daß die Verdickungsleisten der Gefäße sich kräftig rot färben.

Schrifttum

1. DRAWERT, H.: Das Sulfonamid Prontosil solubile als Vitalfarbstoff (Protopl. Bd. 39 Heft 4, S. 688—692, 1950).
2. KÜSTER, E.: Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 50, S. 261—288, 1911).

Referate

Vogel, H., Vom Kristall zum Lebewesen. Grundlagen der Biogenese. Nürnberg (Hans Carl) 1952. 320 S. Ln. DM 12,50.

Es besteht heute in weiteren Kreisen Interesse an einer Aufklärung über die gegen früher erheblich veränderten Auffassungen der Zusammenhänge zwischen leblos und lebend. Das versucht Verf., z. T. gestützt auf die Darstellungen von BAVINK, BERTALANFFY, JORDAN, SCHRÖDINGER, v. WEIZSÄCKER, WENZL u. a., hauptsächlich vom Standpunkt des Chemikers. Nach Meinung des Ref. bringt das Buch zu viel entbehrliche Einzelheiten, was das Herausarbeiten der allgemeinen Gedanken stört; auch wären Bilder an manchen Stellen nützlich gewesen. Daß manche Darlegungen nicht jeden Leser überzeugen werden, versteht sich beim Thema des Buches von selbst.

W. J. Schmidt (Gießen)

Zander, E., Der Bau der Biene. Mit 210 Abb. im Text, größtenteils nach Vorlagen des Verf. 4. verbesserte Auflage. Stuttgart, z. Z. Ludwigsburg (Eugen Ulmer) 1951.

Das bekannte vortreffliche und preiswerte Büchlein (Band III des Handbuches der Bienenkunde in Einzeldarstellungen) erscheint gegenüber der 3. Auflage nur wenig verändert. Es ist nicht nur für den Bienenkundigen wertvoll; sondern, da die Biene in jedem Zoologischen Praktikum ein beliebtes Untersuchungsobjekt darstellt, kann es auch hierfür jedem Lehrer empfohlen werden. Eine kurze Anweisung zur Herstellung der Präparate ist im Anhang beigegeben.

W. J. Schmidt (Gießen)

Walz, W., Die Auflichtmikroskopie, ein Hilfsmittel zur raschen Diagnostik an Operationspräparaten. (D. med. Wschr. **75**, 1559 bis 1561, 1950).

Das durch Probeexzision gewonnene Gewebstück wird in 10%igem Formalin einmal kurz aufgeköcht und dann eine Schnittfläche an das so gehärtete Objekt mit scharfem Skalpell angelegt. Darauf folgt Färbung in Ehrlichs Hämatoxylin (1 ½ bis 2 Minuten), Abspülen in Leitungswasser (1 ½ bis 2 Minuten) und, bei Überfärbung, etwa 20 Sekunden langes Differenzieren in Salzsäurealkohol und anschließend Bläuung in Leitungswasser. Das auf einen Objektträger gebrachte auf der Schnittfläche mit Deckglas versehene Objekt wird unter einem gewöhnlichen Mikroskop, schräg von oben mit einer starken Lichtquelle beleuchtet, beobachtet oder mit einem Auflicht-Dunkelfeld-Mikroskop. Der ganze Vorgang dauert 5 Minuten. Die zur Deutung der Auflichtbilder nötige Erfahrung gewinnt man im Anfang durch Vergleich mit Dünnschnitten im durchfallenden Licht.

W. J. Schmidt (Gießen)

Douglass, P. C., and Crossmann, G. C., Examination of textile fibers by the "Dispersion method". (Textile Res. J. **19** 644—646, 1949.)

Verschiedenerlei Fasern lassen sich an Hand der Dispersionsfarben im Dunkelfeld unterscheiden, wenn sie in eine Flüssigkeit von geeigneter Brechzahl eingelegt

werden. So erscheinen z. B. bei Einschaltung eines Analysators mit der Schwingungsrichtung parallel der Faserachse in 3 Flüssigkeiten mit dem

Brechungsindex	1.550	1.524	1.580
Azetatzellulose	weiß	weiß	weiß
Kupferammoniumzellulose	rötlich purpurn	gelb	weiß
Nylonfaser	gelb	weiß	blau
Seide	gelb, leicht rot	weiß	orange, rotgelb
Viskose	blau, leicht rot	gelb	blauweiß

W. J. Schmidt (Gießen)

Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. (2. Colloquium der Deutschen Gesellschaft für physiologische Chemie am 6./7. April 1951 in Mosbach [Baden]) mit 25 Textabbildungen; IV und 102 Seiten. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952 (Springer-Verlag). DM 9,60.

F. E. LEHMANN (S. 1—23) behandelt die tierische Zelle als strukturelle und funktionelle Einheit, die Methoden zur Erforschung der Zellstrukturen im lebenden und frischen Zustande und dann die generellen Strukturelemente (Kern, Cytoplasma) und ihre Eigenschaften im Hinblick auf ihre makromolekularen Komponenten, unter besonderer Berücksichtigung seiner elektronenmikroskopischen Befunde an Amöben und am Tubifex-Keim. K. LANG (S. 24—47) berichtet über die Lokalisation der Fermente und Stoffwechselprodukte in den einzelnen Zellbestandteilen und deren Trennung (Isolierung von Zellkernen, Mitochondrien, Mikrosomen) und über die Verteilung der Enzyme auf die einzelnen Zellfraktionen. K. FELIX (S. 48—68) gibt einen Überblick der Chemie von Nukleoproteinen und -proteiden, G. SCHRAMM (S. 69—82) eine Übersicht der makromolekularen Struktur der Nukleinsäuren. G. PIEKARSKI (S. 83—101) sprach über Kernäquivalente der Bakterien. Alle Vorträge sind von Diskussionsbemerkungen begleitet. In diesem Kolloquium kamen sehr wesentliche Punkte unserer heutigen Kenntnisse von der Zellorganisation zur Sprache. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Schwöbel, W., Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes. (Protoplasma 41, 21—56, 1952.)

Von den hier verwendeten technischen Hilfsmitteln seien Tauchkappen für Objektive erwähnt, welche die Versorgung des Objektes mit sauerstoffreichem Wasser zugleich mit seinem Festhalten und Pressen zum Ziel haben. Die empfehlenswertere Ausführung besteht aus einer Metallkappe, die unten ein Deckglas trägt und seitlich einen kurzen Luftzuführungsstutzen besitzt; sie wird mit einem Stück Gummischlauch, das über das Objektiv zu schieben ist, daran befestigt und taucht in eine größere Schale ein, auf deren Boden das Objekt ruht. Durch Einführen von Preßluft durch den Ansatzstutzen in den Hohlraum der Kappe, wird das Deckglas an ihren Boden in der Mitte vorgewölbt, so daß man auf diese Weise einen Druck auf das Objekt ausüben kann, der sich während der Beobachtung bis zum Platzen des Eies steigern läßt. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Thiele, H., Gestaltsänderung der Seifenmizelle. (Koll.-Z. 125, 31—32, 1952.)

Seifensole, hergestellt durch Lösen von Seife in Wasser auf dem Wasserbad und allmähliches Abkühlen, sind bald negativ, bald positiv strömungsdoppelbrechend. Ultramikroskopisch ließ sich sicherstellen, daß bei negativer Doppelbrechung plättchenförmige Teilchen vorliegen, bei positiver (in einem mehr alkalischen Sol) aber fast nur Fäden. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Zeiger, K., und Harders, H., Über vitale Fluorochromfärbung des Nervengewebes. (Z. Zellforsch. **36**, 62—78, 1951.)

Nervenzellen vom Frosch, insbes. aus Grenzstrang und Lunge, weiter Cerebralganglion vom Regenwurm wurden in situ mit Acridinorange und Trypaflavin mit dem Zeisschen Lumineszenzmikroskop untersucht. Bei dem ersten Farbstoff zeigt (Ganglienzelle des Frosches) der Kern gelblich fluoreszierende Chromatinstruktur, gelbe Nukleolen, grünes Plasma und in dessen Innenzone kupferro leuchtende Partikel verschiedener Größe. Die Speicherung tritt bevorzugt an ribonucleotidhaltigen Orten ein. Die „lebende Einzelfaser“ v. MURALTS, ist ein zwar funktionstüchtiger, aber durch Präparation beanspruchter strukturell geschädigter Neurit.

W. J. Schmidt (Gießen)

Jenaer Jahrbuch 1951. Wissenschaftliche Veröffentlichung des Zeiss-Werkes. Herausgeber: Optik Carl Zeiss Jena VEB. Jena 1951 (Kommissionsverlag Gustav Fischer). XII und 209 S. 174 Abb. Geb. DM 20,—.

Der Band enthält außer einem Nachruf auf H. Harting (von Schrade) 20 wissenschaftliche Beiträge, von denen hier nur die zur Mikroskopie in näherer Beziehung stehenden erwähnt sind: H. BOEGEHOLD (S. 7—21) behandelt die Geschichte der Zeissischen Mikroskopobjektive bis 1940 mit vielen bisher nach außen kaum bekannt gewordenen interessanten Einzelheiten. K. SCHUSTER (22—36) berichtet „Zur Theorie der Abbildung eines Einzelstreifens nach dem Phasenkontrastverfahren“, insbesondere über das Zustandekommen der Höfe, welche meist die Strukturbilder umgeben und auf Beugung am Phasenplättchen zurückzuführen sind. Die Untersuchung eines Einzelstreifens führte zu folgendem Ergebnis: für Strukturen merklich oberhalb der Auflösungsgrenze hängt das

Zustandekommen der Höfe von der Größe $\frac{\varepsilon}{\pi} = \frac{\delta}{\lambda} 2 \Delta_K$; wird der Streifen so fein

und die Beleuchtungsapertur so gering, daß $\varepsilon/\pi \ll 1$, so fehlen die Höfe; ist die Struktur so grob und die Beleuchtungsapertur so groß, daß $\varepsilon/\pi \gg 1$, so kommt überhaupt kein Bild zustande; im kritischen Übergangsgebiet $\varepsilon/\pi \approx 1$ ist das Bild des Strukturelementes von einem deutlichen Hof umgeben. W. OETTELS Beitrag (36—49) „Ein neuer Schritt in der Entwicklung der Auflichtmikroskopie“ beschreibt die vor allem für die Metallographie wichtige Erweiterung des Sehfeldes durch besondere Kompensationsokulare größeren Durchmessers, die für Planachromate und Planapochromate bestimmt sind (wobei den Planapochromaten derselbe Farbenfehler der Vergrößerung erteilt wurde, wie den Planapochromaten). Die Leistung dieser „Plan-Optik“, die mit reflexvermindernder Schicht versehen ist, wird an Bildern vorgeführt. Diese Optik setzt gute Ebenheit der Anschliffe und sorgsame Bedienung der Leuchtfeldblende voraus. Die Auflichtgeräte wurden für diese Objektive (und zugleich für alle Sorten solcher) umgebaut („Epignost“). Schließlich sei noch im Aufsatz von F. LÖWE, „Staubmeßgeräte und -verfahren für Aufgaben der Gewerbehygiene und der Meteorologie“ (157—184) auf verschiedene Einrichtungen zur Auszählung von Staubflecken unter dem Mikroskop (Staubzähler) hingewiesen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Frey-Wyssling, A., Kontrasteffekt dicker Objekte im Phasenmikroskop. (Naturwiss. **39**, 145—146, 1952.)

Stärkekörner und andere kugel- oder zylinderförmige Objekte von beträchtlichen Durchmesser liefern mit $\frac{1}{4} \lambda$ -Phasenring auffällige Phaseneffekte, obwohl die von ihnen hervorgerufene Verzögerung weit größer ist als nach der Theorie zulässig, z. B. bei einem 25μ dicken Stärke Korn etwa 9 Wellenlängen beträgt. Die Erscheinungen sind insofern von der Brechzahl des Medium abhängig, als sie

in Medien von gleicher Brechzahl wie das Objekt verschwinden. Es handelt sich um eine Linsenwirkung des Objektes zusätzlich eines Phasenkontrasteffektes. Man kann diesen nicht so erklären, daß nach Abzug der ganzen Wellenlängen Bruchteile von λ übrig bleiben, die in Amplitudenunterschiede verwandelt werden; denn planparallele Objekte gleicher Dicke liefern den Effekt nicht.

W. J. Schmidt (Gießen)

Graumann, W., Das Vorkommen von Periodsäure-Leukofuchsin- (PSL-) positiven Substanzen im embryonalen Organismus. (Anat. Anz. **99**, 19–20, 1952.)

Paraffin-Schnittserien (5–6 μ) von Mäuseiern, -embryonen und -feten (Fixierung Pikroformalkohol) wurden nach dem Verfahren von Mc Manus (Stain Technol. **23** [1948] 99) mit Periodsäure in wässriger Lösung oxydiert und dann die Carboxylgruppen mit Leukofuchsin (Schiffschem Reagenz) nachgewiesen: Polysaccharid-Verbindungen. Die Ergebnisse sind in einer Tabelle zusammengestellt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Haselmann, H., Beiträge zur Phasenkontrastmikroskopie I. Mitteilung: Praktische Methodik und kritische Betrachtungen. (Mikroskopie **5**, 214–224, 10 Abb., 1950.)

Verf. benutzt mit Vorliebe für Phasenkontrastbeobachtungen ein apochromatisches Immersionssystem N.A. 1.40 mit der Teilvergrößerung 60 (Winkel-Zeiss), das durch Wechsel des Okulars starke Änderung der Gesamtvergrößerung erlaubt und so den hier so lästigen Objektivwechsel erspart. Es empfiehlt sich, auch bei visueller Beobachtung ein Grünfilter einzuschalten; bei Mikrophotographie ist angesichts der nur achromatischen Korrektur der meisten heute vorliegenden Phasenkontrastobjektive strenge Lichtfilterung unumgänglich. Die Belichtungszeiten liegen wesentlich (3–15mal) höher als im Hellfeld — wegen der ringförmigen Kondensorblende. Hinsichtlich der Objekte ist nicht nur geringe Schichtdicke zu beachten, sondern auch optische Homogenität in dieser Schichtdicke; ist das nicht der Fall, so wird die Kondensorblende in der Objektivöffnung nicht mehr einwandfrei abgebildet und ein guter Kontrast bleibt aus. Die Präparatdicke darf nicht so groß werden, daß eine Abbildung der Kollimatorblende an der Lichtquelle im Sehfeld nicht mehr möglich ist. Am geeignetsten sind isolierte Zellen oder dünne Zellschichten in „physiologischen“ Lösungen, die aber doch manchmal Veränderungen am Objekt hervorrufen. Für Schnitte muß ein geeignetes Einschlußmedium gewählt werden. Canadabalsam, Caedax usw. sind nicht immer brauchbar. Gefärbte Präparate (Azan) lassen im Phasenkontrast oft weitere Einzelheiten erkennen, was an einer Reihe von Bildern vorgeführt wird. Die Deutung der Phasenkontrastbilder bietet Schwierigkeiten; wird doch eine Skala von Lichtbrechungsdaten in eine solche von Grauwerten übertragen; dabei entsprechen die resultierenden Grauwerte nicht eindeutig bestimmten Lichtbrechungsdaten. Bestimmte Strukturen oder chemische Substanzen lassen sich also nicht (wie bei einer spezifischen Färbung) durch bestimmte Grauwerte identifizieren. Die Befunde müssen daher mit denen bei anderen Untersuchungsverfahren verglichen werden.

W. J. Schmidt (Gießen)

Crossmon, G. C., Microscopical distinction of corundum among its natural and artificial associates employing the Christiansen effects by transmitted dark-field illumination. (Anal. Chemistry **20**, 976–977, 1948.)

Man untersucht die Probe von Schleifpulver in Methylenjodid $n_D^{25} = 1,74$ im Dunkelfeld: Korundkörnchen (1,77) erscheinen goldgelb oder gelb mit pur-

purnem oder blauen Rändern; Kieselsäure, Glimmer und die meisten Glassorten zeigen sich weiß. Das Verfahren beruht darauf, daß feste Teilchen in einer geeigneten Flüssigkeit nur für eine Wellenlänge gleiche Brechzahl wie die Flüssigkeit haben und diese Farbe unabgelenkt hindurchlassen, während sie die übrigen ablenken. Im Dunkelfeld gelangen nur die abgelenkten Farben ins Auge. [Vgl. auch G. C. CROSSMON in „The educational Focus“ 20 (1949) 4—10, hier farbige Bilder.]

W. J. Schmidt (Gießen)

Crossmon, G. C., The „dispersion staining“ method for the selective coloration of tissue. (Stain Technology 24, 61—65, 1949.)

Verf. bringt Schnitte formolfixierter Gewebe unter Deckglas in ein Gemenge von Diäthylenglycolmonobutyläther mit Zimtaldehyd und untersucht dann im Dunkelfeld. Diese Flüssigkeit von hoher Dispersion läßt an den Geweben charakteristische blaue, rote, gelbe Dispersionsfarben hervortreten, wenn die Brechzahl der Gewebe annähernd mit der der Flüssigkeit übereinstimmt (ähnlich wie beim Christiansen-Filter).

W. J. Schmidt (Gießen)

Amprino, R., Rapporti fra processi di ricostruzione e distribuzione dei minerali nelle ossa. I Ricerche eseguite col metodo di studio dell'assorbimento dei raggi Roentgen. (Z. Zellforsch. 37, 144—183, 1952.)

Verf. hat zahlreiche Knochenschliffe von Vierfüßern mikroröntgenographisch untersucht nach dem Verfahren von ENGSTRÖM (Acta radiol. [Stockholm] Suppl. 63 [1946]): Die Schliffe wurden in innigen Kontakt mit Lippman Gevaert Feinkornfilm gebracht und, zugleich mit einem Bezugssystem für die Absorption (treppenartig übereinander gelegentem Zelluloid), mit Röntgenlicht durchstrahlt. Die Aufnahme wurde mikroskopisch photometriert und die Absorption gemessen. Wesentliche Ergebnisse: Im primären Knochen ist der Kalkgehalt in den zu verschiedenen Zeiten gebildeten Anteilen nur wenig verschieden und ändert sich auch nicht mit dem Alter. Im sekundären Knochen (Osteonen und Breccie) ist der Kalkgehalt zunächst kleiner als im primären, nimmt aber allmählich zu, mit dem Alter stärker und zwar schneller in den Anteilen, die mit den Gefäßkanälen in Berührung stehen. (Mit dem letzten bestätigt Verf., wie er hervorhebt, entsprechende polarisationsoptische Befunde des Ref. von 1933.) Der Abbau der Grundsubstanz betrifft hauptsächlich stark verkalkte Anteile.

W. J. Schmidt (Gießen)

Schwarz, W., und Schuchardt, E., Die Struktur des frischen Glaskörpers. Untersuchungen im Phasenkontrast-, Dunkelfeld- und Immersions-Ultramikroskop. (Z. Zellforsch. 35, 292—310, 13 Abb., 1950.)

Untersuchungen am lebendfrischen Glaskörper von Rind (auch Kalb), Schwein, Schaf, Kaninchen. Im Phasenkontrast und allseitigen Dunkelfeld (Bogenlampe als Lichtquelle!) treten mikroskopische Strukturen (Fasern, Netzwerk) hervor. Damit verliert die Geltheorie des Glaskörpers den Boden. Neben Rundzellen lassen sich spinnenförmige an bestimmten Stellen sichtbar machen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Crossmon, G. C., Dispersion staining with phase contrast microscope accessories. The microscopic identification of quartz. (Science 110, 237—238, 1949.)

Im Phasenkontrastmikroskop lassen sich die Dispersionsfarben in mancher Hinsicht besser beobachten als im Hellfeld und Dunkelfeld; sie treten bei scharfer Einstellung des Objektes hervor und sind glänzender als im Hellfeld. Benutzt man

olarisiertes Licht, so erhält man für die verschiedenen Stellungen eines doppel-rechenden Objektes unterschiedliche Bilder, so daß z. B. Teilchen, die in einer Lage nicht sichtbar sind, in der anderen hervortreten. Das wird des näheren erläutert an Quarzpulver in einer Flüssigkeit von $n_D^{25^\circ} = 1,544$. Man gewinnt sie durch Mischung von Diäthylenglykolmonobutyläther ($n_D = 1,429$) und Zimtaldehyd (1,619) nach der Formel $V_1 n_1 + V_2 n_2 = V_x n_x$, worin V_1 und V_2 die Volumina der zu mischenden Flüssigkeiten, n_1 und n_2 die zugehörigen Brechzahlen und V_x und n_x das gesuchte Volumen und die gesuchte Brechzahl sind. Um die gewünschte Brechzahl 1,544 zu erhalten, hat man 3,95 ccm des genannten Äthers und 6,05 ccm des Aldehyds nötig nach folgender Rechnung:

$$1,429 V_1 + 1,619 V_2 = 10 \times 1,544$$

$$1,429 V_1 + 1,429 V_2 = 10 \times 1,429$$

Durch Subtraktion beider Gleichungen erhält man

$$0,190 V_2 = 1,15$$

$$\text{also } V_2 = 6,05 \text{ ccm}$$

$$\text{und } V_1 = 3,95 \text{ ccm, da } V_1 + V_2 = 10.$$

Da Zimtaldehyd leicht zu Zimtsäure oxydiert, hebt man das Gemisch in einer kleinen möglichst gefüllten Flasche auf. Im nicht polarisierten Licht zeigen sich Quarzkörner blau mit orange, im polarisierten bei Wirksamkeit von $n_a = 1,553$ des Quarzes blau mit gelb und bei $n_o = 1,544$ blau mit rot. In einer Flüssigkeit mit der Brechzahl 1,553 erscheinen Quarzkörner im gewöhnlichen Licht blau, gewöhnlich mit sehr dunklem Rand, im polarisierten blau mit rot (n_a), bzw. blau mit weiß. Rot orange und gelb erscheinen gewöhnlich als farbige Ränder, blaue Ringe über dem größeren Teil des Quarzkornes. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Höfler, K., Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. (Protopl. Bd. 40, Heft 3/4, S. 426—460, 1951.)

In hypertonen Lösungen von Na_2CO_3 verhalten sich die vom Verf. untersuchten Pflanzenzellen verschieden — entweder sie gehen alsbald zugrunde und zeigen zunächst „Tonoplasten-Plasmolyse“, falls die Vakuolenhülle zunächst noch eine Semipermeabilität behält — oder die Plasmolyse zeigt das gewöhnliche Bild, bis das Protoplasma verquillt und abstirbt. Algenzellen verhalten sich gegenüber Sodalösungen im allgemeinen widerstandsfähig; manche bleiben sogar tagelang in ihr am Leben. Verf. führt die ungleiche Wirkung der Sodalösung auf die Zellen verschiedener Art ungleich große Durchlässigkeit der äußeren Plasmagrenzschicht zurück, so daß es ihm zulässig scheint, aus dem Verhalten des Protoplasmas in Sodalösung Schlüsse auf Ausbildung des Plasmalemmas zu ziehen; dieses sei bei Landblütenpflanzen schwach, bei Süßwasseralgen und insbesondere bei den Desmidiaceen stark entwickelt; den Peridineen und begeißelten Volvocales scheint ein geschlossenes Plasmalemma zu fehlen; die Zellen der Spirogyra liefern in hypertonen Sodalösung das Bild einer „bunten“ Nekrose, d. h. benachbarte Zellen des nämlichen Fadens verhalten sich verschieden und gehen zum Teil zugrunde. *Küster* (Gießen)

Hofmeister, F. L., Eine einfache Apparatur für quantitative Mikroinjektion nebst Bemerkungen über plasmatische Injektion. (Protopl. Bd. 39, Heft 3, S. 323—332, 1950.)

Der vom Verf. konstruierte Injektionsapparat arbeitet mit einer elastischen Dose, deren Volumen mit einer Mikrometerschraube verändert wird. Abgabe und Aufnahme meßbarer Flüssigkeitsmengen erleichtert der Verf. durch Aufnahme

eines Quecksilbertropfens in der Pipette dort, wo der Durchmesser derselben von 1 bis 1,5 mm sich auf 0,1—0,2 mm verjüngt, und durch die Aufnahme von Paraffinöl in die Pipettenspitze vor dem Ansaugen der Injektionsflüssigkeit.

Küster (Gießen)

Luhan, N., und Toth, H., Einige Rezepte zur Fluorochromierung pflanzlicher Gewebe. (Mikroskopie Bd. 6, Heft 9—10, S. 299—301, 1951)

Die Verf. stellen nach Erscheinen der Neuauflage des von der Fa. C. Reicher herausgegebenen Rezeptheftes: „Fluoreszenzmikroskope und Fluorochrome“ einige an botanischen Objekten gesammelte Erfahrungen zusammen.

Küster (Gießen)

Perner, E. S., Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre physiologische Wirkung auf Zellen höherer Pflanzen. (Ber. d. D. Bot. Ges. Bd. 65, Heft 3, S. 52—59, 1952.)

Die im Plasma pflanzlicher Zellen liegenden Mikrosome (Sphärosome), deren Entstehen man bisher auf Lipophanerose zurückführte und die man als fettige Entmischungstropfen ansprach, lassen (Zwiebelschuppen von *Allium cepa*) nach Fixierung mit O_3-O_4 und nachfolgender 6—12stündiger Extraktion mit Xylostrukturen zurück, die keine Lipoidreaktion mehr geben und sich mit basischen Plasmafarbstoffen (Rosanilin, Pyronin) färben lassen¹⁾, so daß neben Lipoiden noch proteinartige Stoffgruppen in den Mikrosomen zu suchen sind; die an ihnen beobachtete Indophenolblau-Synthese spricht dafür, daß die bei dieser wirksamen Cytochromoxydase in den Oberflächenstrukturen der Mikrosome ihre Wirksamkeit entfaltet. Färbung mit Berberinsulfat: Epidermen der Zwiebelschuppen von *Allium* 10—30 Min. in gepufferter Farbstofflösung 1 : 10000 in 1/150 mol Phosphatpuffer gelöst, 15 Min. wässern, dann in 1/150 mol Phosphatpufferlösung gleichen pH-Wertes fluoreszenzmikroskopisch untersuchen; die Mikrosome erscheinen innerhalb eines weiten pH-Bereiches vom alkalischen Gebiet bis zu pH 4,5 intensiver gelbgrüner oder goldgelber Fluoreszenz; Verf. schließt auf einen spezifischen Speicherungseffekt an ihren Oberflächenstrukturen; die Fähigkeit zur Bindung des Berberinsulfates geht den Mikrosomen leicht verloren — z. B. nach einer 15 Min. währenden Bestrahlung mit blauem Licht oder nach 10 Min. Abschluß von Sauerstoff; zugleich macht sich die Zunahme der Kernfluoreszenz bemerkbar und im extrem alkalischen Gebiet (pH größer als 10,4) eine schwache diffuse Zytoplasmafärbung; fixierte Zellen zeigen keine Mikrosomenfluoreszenz

Küster (Gießen)

Rijven, A. H. G. C., In vitro studies on the embryo of *Capsella bursa pastoris*. Proefschrift Amsterdam 1952.

Verf. beschreibt die Nährlösungen, die sich bei der Kultur explantierter Embryonen bewährten. Die Mehrzahl seiner Versuche wurde mit der Lösung von OLSEN (1950) durchgeführt; als Wachstumsstoffe wurden Para-aminobenzoessäure, Inositol, Laktoflavin, Folsäure und Biotin zugefügt; Zucker kam in höheren Konzentrationen zur Verwendung (80 g im Liter) als in OVERBEEKS Versuchen (1942). Aminosäuren wurden mit TRISTAMS Edestin 1949 zugesetzt.

Küster (Gießen)

¹⁾ Vgl. PERNER, E. S., Untersuchungen über den zell-physiologischen und zytologischen Nachweis und die Lokalisation der Cytochromoxydase in *Allium*-Epidermis-Zellen (Biol. Zb. Bd. 71, S. 43, 1952).

Molè-Bajer, J., Influence of hydration and dehydration on mitosis I. (Acta soc. botan. Poloniae vol. **21**, S. 73, 1951.)

Schon bei Behandlung der Objekte (Staminalhaare von *Tradescantia virginica*, tetraploide Form) mit 0,0001% KNO_3 werden Wirkungen auf die zeitlichen Eigenschaften des Mitoseverlaufs nachweisbar. Vor allem geht die Anaphase schneller vor sich; am stärksten in diesem Sinne wirkte 0,3%ige Lösung; noch stärkere Lösungen (bis 0,8%) bewirkten eine Verlangsamung desselben Vorganges. Das Brechungsvermögen des Protoplasmas und der Chromosome nimmt in den KNO_3 -Lösungen ab.

Küster (Gießen)

Gottschalk, W., Untersuchungen an Pachytaen normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. (Chromosoma Bd. **4**, S. 289—341, 1951, mit 20 Textabbildungen.)

Gottschalk, W., Der Vergleich von Röntgen- und chemisch induzierten Chromosomenmutationen im Pachytaen von *Solanum lycopersicum*. (Chromosoma **4**, 342—358, 1951, mit 4 Textabb.)

Färbung mit Eisenkarmin (GEITLER); nach 24 Std. deutlicher Kontrast zwischen den sehr feinen, schwach färbbaren euchromatischen Chromosomenenden und der Karyolymphe. Übertragung in eisenfreies Essigsäurekarmin erhält für 24 Std. die Objekte in optimalem Färbungsgrad. Eine Modifikation der Methode arbeitet mit stärkerem Eisenzusatz ($1 \text{ cm}^3 \text{ FeCl}_3$ auf 100 cm^3 Eisessigkarmin; 8—10 Std.).

Küster (Gießen)

Metzner, H., Über den Nachweis von Nukleinsäuren in den Chloroplasten höherer Pflanzen. (Naturwiss. Jg. **39**, H. 3, S. 64—65, 1952.)

Methylgrün (1% in 0,75%iger Essigsäure) färbt Desoxyribonukleinsäure, Pyronin (1% in Wasser) färbt Desoxyribo- und Ribonukleinsäure-Komplexe. Ersteres wird innerhalb der Plastiden nur von den Granis gespeichert, letzteres ergab bisweilen verwaschene Stromafärbung. Deutliche Methylgrünfärbung tritt auch nach Salzsäurehydrolyse und Beseitigung der Ribonukleinsäure noch ein (Granafärbung); Pyronin wird deutlich weniger gespeichert. Beseitigung beider Nukleinsäuren (15 Min. in 20% Trichloressigsäure bei 90°C) vernichtet die Basophilie der Plastiden.

Küster (Gießen)

Wagner, E., Zytologische Untersuchungen über Meiose und Pollenentwicklung weiblicher Rebensorten. (Chromosoma Bd. **4**, S. 439 bis 455, 1951.)

Um auch von Ruhekernen und Prophasen gute Bilder zu gewinnen, lasse man die Objekte mindestens 14 Tage in dem Fixiermittel (Alkohol-Eisessig) liegen. Die Antheren der noch im Knospenzustand sich befindenden Blüten enthalten ausschließlich sporogenes Gewebe; erst wenn die basalen Verzweigungen der Blütenstände anfangen sich abzuspreizen, kann man damit rechnen, daß in den Antheren der größten Knospen Pollenmutterzellen mit Meiose I anzutreffen sind.

Küster (Gießen)

Hütter-Kanert, M., Über die Tüpfel von *Ceramium* (Protopl. Bd. **40**, 1951, S. 397—402).

Färbung der Membranen mit Methylenblau. Bei Behandlung der gefärbten Membranen, Tüpfel und Schließhäute fällt die Verteilung der ausfallenden blauen Partikel auf (vgl. diese Zeitschrift Bd. **60**, 1951, S. 257), aus der sich Schlüsse auf Feinstruktur oder Oberflächenbeschaffenheit der Membranen ziehen lassen. Die Tüpfel sind von einem ansehnlich großen Hof umgeben, dessen optische und färbereiche Qualitäten die Verfasserin beschreibt.

Küster (Gießen)

Höfler, K., u. Schindler, H., Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration (Protopl. Bd. 40, 1951, S. 137—151).

Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff, dessen Umschlagspunkt bei pH 10—11 liegt; die Mehrzahl der Algen zeigt vitale Zellsaftfärbung erst bei stark alkalischer Reaktion. Bei $pH = 6$ liegt die vitale Färbeschwelle für einige Diatomeen; erwähnt werden die in ihrem Plasma außerhalb der Vakuole liegenden Körnchen, die sich satt blau färben; für ihre Färbung dürfte der kleine Prozentanteil undissoziiert gebliebener permeifähiger Farbsalzmoleküle im Farbbad verantwortlich sein, der im Protoplasten an Orten stärksten Speichervermögens festgelegt wird.

Küster (Gießen)

Toth, A., Mikrurgische und mikrochemische Untersuchung der festen Anthocyankörper im Blütenblatt von Pelargonium zonale (Protopl. Bd. 40, 1951 S. 187—194).

Die in den Kronenblättern von Pelargonium gefundenen Anthozyanaustrittungen stellen eine spröde Masse dar, die beim Angriff durch die Mikromanipulatornadel in Teilstücke mit zackigem Bruch zerfällt, ohne Spuren von austretendem Farbstoff erkennen zu lassen. Das Anthozyan der schwachroten Kugeln zeigt andere chemische Eigenschaften als das im Zellsaft gelöste; ersteres ist offenbar (Behandlung mit HNO_3 und Millons Reagens) an eine eiweißreiche Grundsubstanz gebunden, so daß wie bei Gunnera und Erythraea von Anthozyanophoren gesprochen werden darf.

Küster (Gießen)

Drawert, H., Das Sulfonamid Prontosil solubile als Vitalfarbstoff (Protopl. Bd. 49, H. 4, 1950, S. 688—692).

Prontosil ist ein nicht lipoidlöslicher Säurefarbstoff; er ist relativ ungiftig, als Vitalfarbstoff aber nur in beschränktem Umfang brauchbar. *Küster (Gießen)*

Rippel-Baldes, A., Grundriß der Mikrobiologie. 2. Aufl. Mit 153 Abbildungen, 404 pp. Berlin-Göttingen-Heidelberg (Springer-Verlag) 1952. Ganzleinen 36 DM.

Ergebnisse selbständiger Disziplinen der naturwissenschaftlichen Forschung nach gemeinschaftlichen Gesichtspunkten zu einer „Gesamtschau“ wohlgeordnet zu verbinden und dabei zu einer selbständigen neuen Disziplin zu vereinigen, ist ein Verfahren, das sich schon mehr als einmal ausgezeichnet bewährt und die naturwissenschaftliche Forschung gefördert hat. Des Verf. vorliegende Mikrobiologie fügt nach Gesichtspunkten der angewandten Biologie, die in erster Linie die Erforschung der der menschlichen Ernährung dienenden Objekte und Vorgänge zu ihrer Aufgabe macht, Ergebnisse der Botanik, der Agrikulturchemie und der Fermentforschung zusammen.

Die vorliegende neue Auflage ordnet den umfangreichen Stoff in derselben Weise wie die erste. Mit dem der Zelle geltenden 1. Kapitel liefert Verf. eine dem Biologen willkommene zytologische Darstellung der Bakterien und Aktinomyzeten, der Myxomyzeten und Myxobakterien, der Archi-, Phyko- und Eumyzeten; die den neuesten Forschungsergebnissen Rechnung tragende, von nichtmedizinischer Seite erfaßte Zytomorphologie der Protophyten wird von vielen Seiten sehr begrüßt werden. Als 2. Kapitel folgt eine Behandlung des Bau- und Betriebsstoffwechsels der genannten Lebewesen und als letzter Abschnitt eine Darstellung der Rolle, die die Mikroorganismen in der Natur spielen; sehr ausführlich werden dabei die Erscheinungen der Symbiose behandelt.

Die neue Auflage übertrifft die frühere durch ihre Inhaltsfülle und durch die Schönheit der Ausstattung.

Küster (Gießen)

Feinbau der Diatomeenschalen in Einzeldarstellungen*)

3. Die Gattung *Melosira* Ag.

Von J.-G. Helmcke und W. Krieger

Mit 30 Abbildungen

Für den dritten Beitrag wurde im Gegensatz zu den beiden ersten Untersuchungen*) ein Vertreter der *Centricae*, und zwar die Gattung *Melosira*, gewählt.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der *Melosira*-Schale stößt auf Schwierigkeiten. Die Längsachse der zylindrischen Zellen liegt normalerweise parallel der Objektträgerfolie. Die Elektronenstrahlen müssen daher die Mantelwände zweimal durchdringen, und dabei werden sie so stark absorbiert, daß im Endbild keine Einzelheiten der Membran mehr zu erkennen sind. Um hier zu einem befriedigenden Erfolg zu kommen, muß man entweder schräg liegende Zellen oder Bruchstücke untersuchen. Oft hilft auch eine Aufhellung durch Graphitierung und nachträgliches Herauslösen der Kieselsäure. Bei der Deutung dieser Bilder ist dann jedoch zu berücksichtigen, daß die zurückbleibende sehr dünne Graphithaut leicht zusammenfällt, so daß die ursprüngliche Form der Zelle oft kaum zu erkennen ist.

Die Untersuchung einer Anzahl von *Melosira*-Arten ergab, daß bisher in dieser Gattung mehrere Typen von unterschiedlichem Membranbau zusammengefaßt worden sind, deren systematische Zusammengehörigkeit problematisch erscheint.

a) *Melosira varians* Ag.

Das Material für die vorliegende Untersuchung wurde aus Gräben der Nuthe-wiesen bei Potsdam gesammelt. Die gefundene Form entspricht der Art-Diagnose bei HUSTEDT in Rabenhorst 1927, S. 240 (Abb. 1).

Lichtmikroskopisch sind Einzelheiten der Membranskulptur mit Ausnahme einiger Punkte in der Nähe des Mantelrandes auch mit der besten Optik nur an-

*) 1. Einzeldarstellung — *Cocconeis placentula* (EHRENBERG). Z. wiss. Mikrosk. **60**, 85—100, 1951;

2. Einzeldarstellung — Gattung *Achnanthes* Bory. Z. wiss. Mikrosk. **60**, 197—202, 1951.

Ferner:

3. Einzeldarstellung — *Pleurosigma angulatum* W. Sm. (im Druck);

4. Feinbau der Kieselschalen der Diatomee *Cyclotella comta* (EHRENBERG). Kütz; Ber. Bot. Ges. 1952, **65**, 70—72

5. Neue Erkenntnisse über den Schalenbau von Diatomeen. Naturwiss. **39**, 146—149, 1952;

6. Demonstration einiger raumrichtiger Rekonstruktionszeichnungen von Diatomeenschalen. Verh. Dt. Zool. Ges. Wilhelmshaven 1951, Leipzig 438—443;

7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Membranbau der Diatomeen. Ber. Bot. Ges. (im Druck).



Abb. 1. *Melosira varians* Ag. (nach HUSTEDT) 600 : 1

deutungsweise zu erkennen; im Elektronenmikroskop ist die Struktur ohne weiteres aufzulösen.

Abb. 2 zeigt, daß die Membran des Mantels ein Maschennetz darstellt, dessen Elemente nur in der Nähe des Mantelrandes in parallelen Längsreihen angeordnet sind. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 3) erkennt man ein enges Netz, dessen einzelne Öffnungen unregelmäßig 3—5 eckig sind. Die entstehenden Kammern sind zum Innenraum durch eine dünne Membran verschlossen, die in der Mitte eine kreisrunde Öffnung aufweist; diese Öffnung ist zuweilen durch einen Querbalken geteilt. An der Außenseite der Kammern befindet sich ebenfalls eine zarte Haut mit sehr feinen Siebporen, die nur schwer sichtbar gemacht werden können.

In Abb. 3 sieht man eine größere Zahl von Poren, die sowohl unter den Kammern als auch unter den Wänden zu erkennen sind. Die letzteren erscheinen etwas dunkler. Bei genauer Betrachtung erkennt man, daß diese Poren in Schrägzeilen angeordnet sind. Sie befinden sich in einer Hüllmembran, die den ganzen Mantel umgibt und besonders da deutlich wird, wo sie über diesen hinausragt (Abb. 4). Über dem Diskus fehlt diese Haut (Abb. 7).

Vor dem Mantelrand ist die Halbzelle ein wenig eingezogen; über den etwas hervorragenden Rand greift das an dieser Stelle ausgefranzte Gürtelband (Abb. 5), das hier eine in der Abbildung erkennbare dunkle Ringleiste aufweist. Genauer Studium ergab, daß in dieser Ringleiste eine Rinne vorhanden ist, in die der Mantelrand hineinpaßt. Die Übersichtszeichnung (Abb. 8) macht die Verhältnisse deutlich. Das Gürtelband läßt eine Längsstreifung erkennen, die in der Mitte aus Doppelpunkten besteht und nach dem freien Rande in eine größere Zahl von Schrägstreifen ausläuft. Nach dem Mantelrande zu folgen die Punkte in den einzelnen Reihen immer dichter aufeinander, bis sie zu schmalen Spalten verschmelzen, deren lichte Weiten spiralig ausgebildet sein können.

Abb. 2. *Melosira varians* Ag. Einblick in eine schräg auf der Unterfläche aufliegende Schalenhälfte. Maßstab 4900 : 1

Abb. 3. *Melosira varians* Ag. Schalenrand mit Gallertporen Maßstab 11000 : 1

Abb. 4. *Melosira varians* Ag. Freier Rand der Hüllmembran. Maßstab 13000 : 1

Abb. 5. *Melosira varians* Ag. Gürtelband. Maßstab 12000 : 1

Abb. 6. *Melosira varians* Ag. Membran des Zwischenbandes. Maßstab 2000 : 1

Abb. 7. *Melosira varians* Ag. Diskus mit kleinen Gallertporen und Stacheln. Maßstab 7200 : 1

Abb. 8. *Melosira varians* Ag. Bau der Schale. (Schematische Rekonstruktionszeichnung: Kurt BOGEN; Photogrammetrische Ausmessung als Grundlage für diese Zeichnung: Photogrammeter Hans RICHTER)

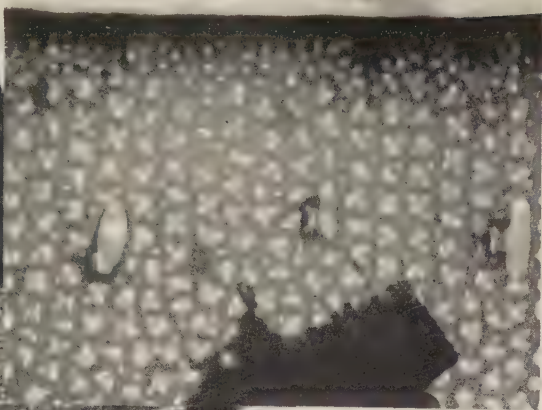
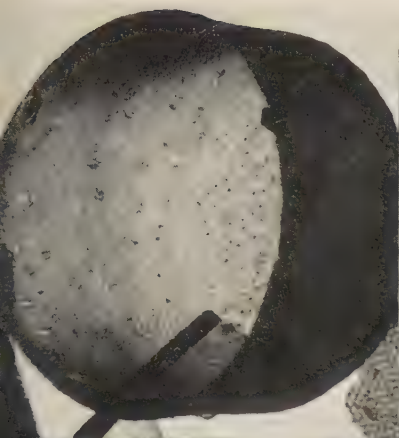


Abb. 3

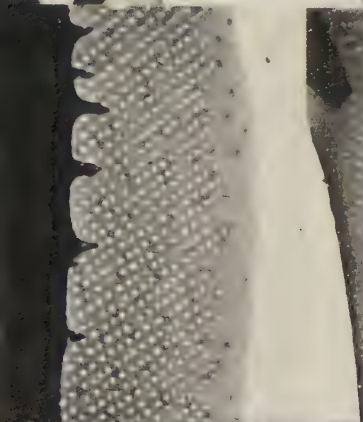


Abb. 6

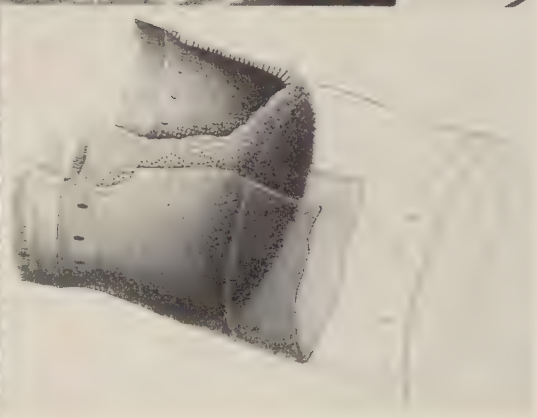


Abb. 8

Tafel I

Auf das Gürtelband folgen die Zwischenbänder, die eine ganz andere Zeichnung besitzen (Abb. 6). Hier stehen die Poren in dichten Schrägzeilen, die nach unten durch eine flache Ringleiste begrenzt werden. Der untere Rand ist ebenfalls ausgefranst. Sowohl das Gürtelband als auch die Außenmembran können an einer Stelle unterbrochen sein. Der benachbarte Membranring weist an dieser Stelle eine Zunge auf, die in Abb. 6 dargestellt ist.

Die auch im Lichtmikroskop deutlich sichtbaren Punkte am Rande des Mantels stellen sich bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 3) als elliptische Öffnungen der äußeren Hülle dar. Sie stehen mit einem strichförmigen Porus (Gallertporus) in Verbindung, der den Mantel durchbricht und an der Innenwand desselben von einem elliptischen Wall umgeben ist. Ähnliche Poren, wenn auch etwas kürzer, sind unregelmäßig über den Diskus verstreut (Abb. 7); es fehlen jedoch die Öffnungen in der Außenmembran, da diese am Diskus nicht vorhanden ist.

Die dunklen Flecke, die in Abb. 2 unregelmäßig über die Mantelfläche verteilt sind, stellen sich als breit-konische Stacheln heraus, die den Kammerwänden aufgesetzt sind. Der Diskusrand ist mit mehreren Reihen schlanker Dornen (Länge im Durchschnitt $0,68 \mu$) besetzt, die auch im Lichtmikroskop gerade noch zu erkennen sind. Auf der Diskusfläche werden die Stacheln wieder kürzer (Abb. 7) und stehen wesentlich dichter als auf dem Mantel. Am Diskus sind die Kammern kleiner als am Mantel und stärker gerundet.

b) *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag.

Die Art ist marin, kommt aber auch im Binnenlande in Salinen vor und ist z. B. in Artern, woher das Untersuchungsmaterial stammt, sehr häufig.

Über den Zell- und Membranbau, soweit er sich im Lichtmikroskop feststellen läßt, gibt die Abbildung bei HUSTEDT (Rabenhorst 1927, S. 232, Abb. 96) Auskunft (Abb. 9).

Eine Aufnahme bei 5100facher Vergrößerung (Abb. 10) läßt erkennen, daß die Membrankammern mehr oder weniger rechteckig sind. Sie sind in Längsreihen

Abb. 9. *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag. (nach HUSTEDT) 700 : 1

Abb. 10. *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag. Schalenbruchstück. Maßstab 5100 : 1

Abb. 11. *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag. Schalenbruchstück. Maßstab 16000 : 1

Abb. 12. *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag. Teil eines Gürtelbandes. Maßstab 8500 : 1

Abb. 13. *Melosira nummuloides* (Dillw.) Ag. Bruchstück der Schale in der Höhe des Kieles (Schematische Rekonstruktionszeichnung: Kurt BOGEN; Photogrammetrische Ausmessung als Grundlage für diese Zeichnung: Photogrammeter Hans RICHTER.)

Abb. 14. *Melosira Juergensi* Ag. (nach HUSTEDT) 750 : 1

Abb. 15. *Melosira Juergensi* Ag. Bruchstück der Schale. Maßstab 5300 : 1

Abb. 16. *Melosira Juergensi* Ag. Bruchstück der Schale mit angebrochenen Kammern und äußerer Verschlussmembran. Maßstab 6000 : 1

Abb. 17. *Melosira Juergensi* Ag. Diskus. Maßstab 4000 : 1

Abb. 18. *Melosira Juergensi* Ag. Teil des Zwischenbandes. Maßstab 3500 : 1

Abb. 10

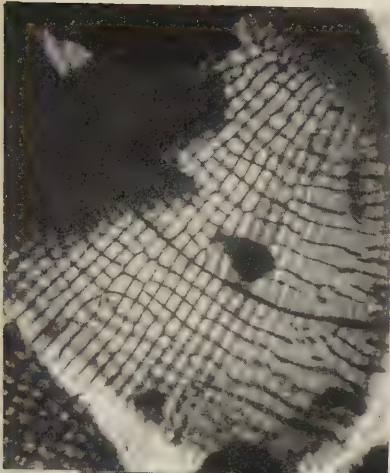


Abb. 9



Abb. 13

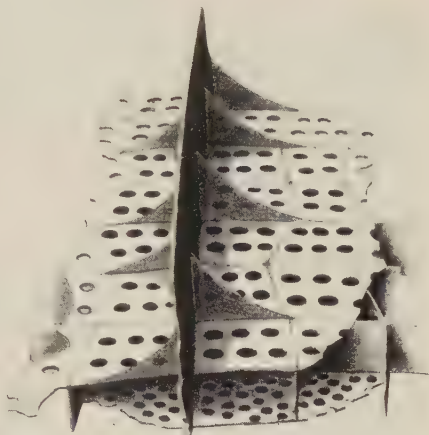


Abb. 12

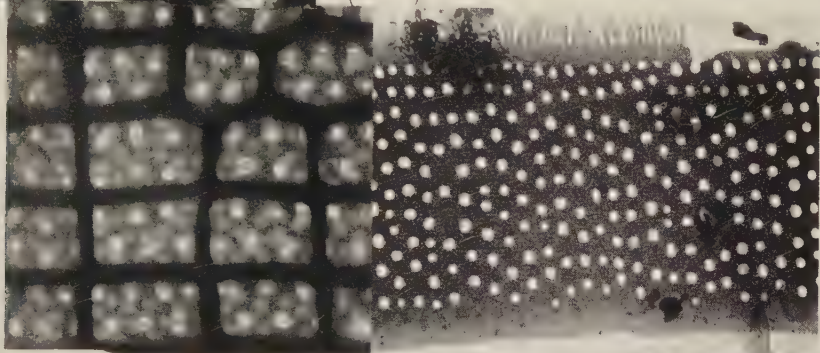


Abb. 18

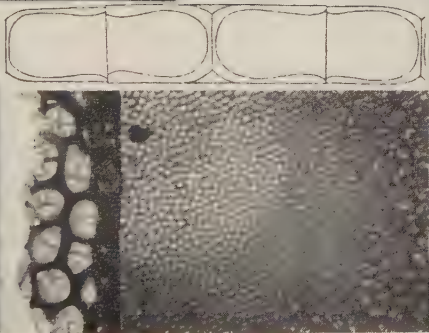


Abb. 16

Abb. 17

Abb. 14 (quergelegt)

(30—36 in 10μ) und gewellten Querreihen (20—21 in 10μ) angeordnet. Bei starker Vergrößerung sieht man (Abb. 11), daß die Kammern oben und unten durch eine Membran verschlossen sind. Die innere Verschlauhaut weist je nach der Länge der Kammern 4—8 kreisrunde Löcher von 100—110 $m\mu$ Durchmesser auf, die in Längsreihen angeordnet und oft durch einen Querbalken gestützt sind. Die Außenwand ist mit unregelmäßig verteilten Siebporen von 60—70 $m\mu$ Durchmesser versehen, von denen meistens 10—17 auf eine Kammer kommen. Am Scheitel sind auch bei dieser Art die Kammern kleiner, abgerundet und unregelmäßig angeordnet.

In einiger Entfernung vom Scheitel verläuft ein Kiel rings um die Zelle, der in Abb. 10 als dunkle Linie in der Mitte des Bildes sichtbar ist. Bei stereoskopischer Betrachtung sind beiderseits des Kiels dreieckige Stützen erkennbar, die von den Längswänden der Kammern ausgehen und nach dem Kiel zu allmählich an Breite abnehmen (Abb. 13).

Der Teil eines Gürtelbandes ist in Abb. 12 dargestellt. Die Membran ist hier von Längsreihen mehr oder weniger kreisförmiger Poren durchbrochen, die einen Durchmesser von 140—180 $m\mu$ aufweisen. Der Rand ist wieder mit sehr feinen Fransen von 360—500 $m\mu$ Länge versehen.

c) *Melosira Juergensi* Ag.

Das Material für die Untersuchung dieser Brackwasserart wurde an der Westseite der Insel Sylt gesammelt. Der Bau der Zelle geht aus der Beschreibung bei HUSTEDT (Rabenhorst 1927, S. 239) hervor (Abb. 14).

Die Kammern des Mantels sind im Gegensatz zu *Melosira nummuloides* in regelmäßigen Schrägzeilen nach Art der Bienenwaben angeordnet (Abb. 15). Sechs Kammern sind in Form eines Sechseckes um eine zentrale Kammer gruppiert (Quincunx-Stellung). Die Kammern selbst sind sechseckig und haben einen Durchmesser von etwa $1,14\mu$. Nach innen zu besitzen sie eine kreisförmige Öffnung von etwa 380 $m\mu$. Die äußere Verschlauhaut ist mit zahlreichen (12—15) Siebporen versehen (Durchmesser etwa 80 $m\mu$) (Abb. 16). Zuweilen ist diese Haut durch Querbalken versteift (Abb. 16).

Nach den Zellenden zu ist die Anordnung der Kammern unregelmäßiger und mehr oder weniger radial. Die Endkalotte ist mit zahlreichen dichtstehenden Poren bedeckt, die größer als die Siebporen sind. Sie haben wahrscheinlich die Funktion von Gallertporen. Stachelbildung wurde nicht beobachtet.

Abb. 18 stellt ein Zwischenband dar, auf dem die Poren (Durchmesser etwa 300 $m\mu$) in Längsreihen angeordnet sind. Das keilförmige Zwischenstück und der untere Rand des Zwischenbandes sind ausgefranst.

d) *Melosira ambigua* (Grun.) O. MÜLL.

Als Vertreter der planktonischen *granulata-italica*-Gruppe wurde *Melosira ambigua* gewählt. Diese Art ist in den eutrophen Seen Norddeutschlands nicht selten und tritt besonders in den Sommermonaten auf. Das Untersuchungs-

Abb. 19

Abb. 20

Abb. 21

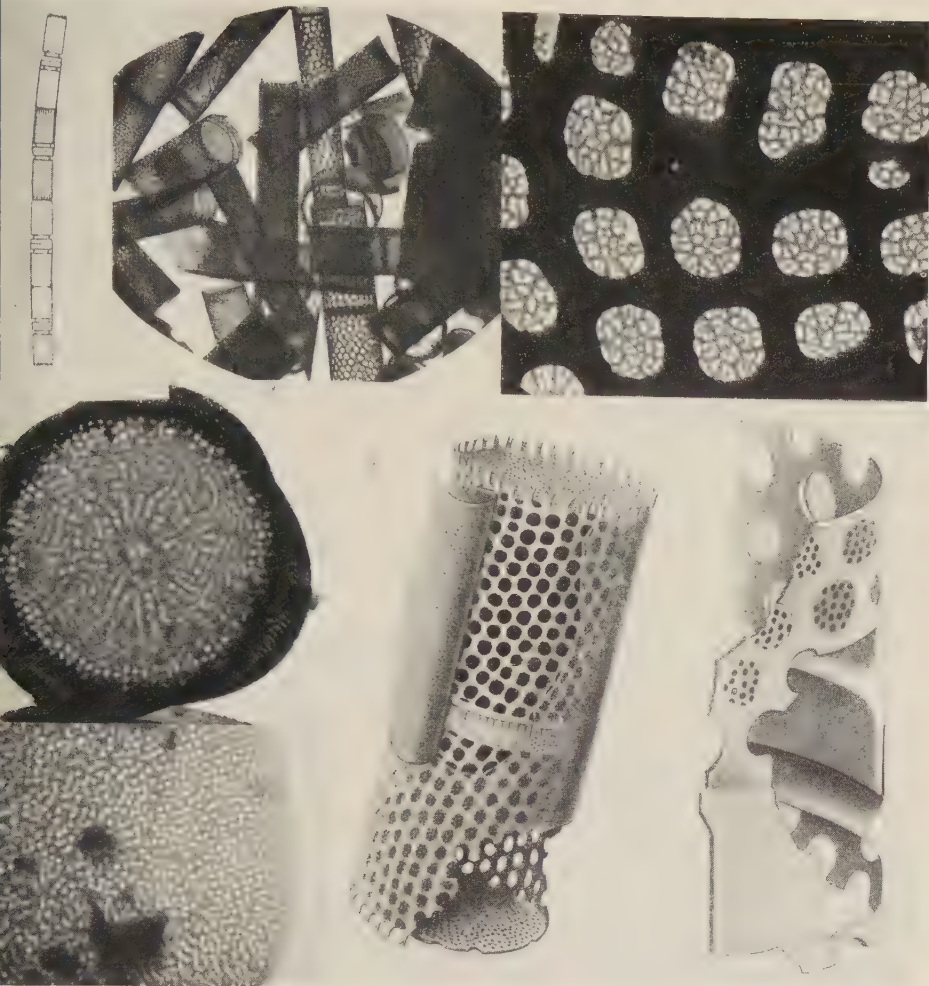


Abb. 24

Abb. 25

Tafel III

- bb. 19. *Melosira ambigua* (Grun.) O. MÜLL. (nach HUSTEDT) 500 : 1
 bb. 20. *Melosira ambigua* (Grun.) O. MÜLL. Variabilität der Schalen. Maßstab 1000 : 1
 bb. 21. *Melosira ambigua* (Grun.). Bruchstück der Schale mit Siebplatten in den Kammern. Maßstab 32 000 : 1
 bb. 22. *Melosira ambigua* (Grun.). Diskus. Maßstab 2400 : 1
 bb. 23. *Melosira ambigua* (Grun.). Hüllmembran. Maßstab 10 000 : 1
 bb. 24. *Melosira ambigua* (Grun.) O. MÜLL. Bau der Schale. (Schematische Rekonstruktionszeichnung: Kurt BOGEN; Photogrammetrische Ausmessung als Grundlage für diese Zeichnungen: Photogrammeter Hans RICHTER)
 bb. 25. *Melosira ambigua* (Grun.) O. MÜLL. Rekonstruktionszeichnung eines Bruchteiles der Schale

material stammt aus dem Müggelsee bei Berlin. Über die lichtmikroskopischen Untersuchungsergebnisse siehe bei HUSTEDT in Rabenhorst 1927, S. 256—257 (Abb. 19).

Eine Elektronenaufnahme bei etwa 1000facher Vergrößerung eines fast reinen *ambigua*-Materials läßt die starke Variabilität in Länge, Breite und Porengröße erkennen (Abb. 20). Eine Übersicht über den Bau der Zellwand gibt die beigefügte Zeichnung (Abb. 24), die nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt wurde. Sie läßt deutlich die s-förmig gebogenen Porenreihen des Mantels erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 25) sieht man den komplizierten Bau der Siebplatten, die die Poren nach außen verschließen. Die Porengröße ist auch an Einzelzellen variabel; sie schwankt in Abb. 21 zwischen 230 und 460 m μ .

Die Zellenden sind mehr oder weniger deutlich bedornt. Die Stacheln sind am Ende leicht gegabelt. Der Diskus erscheint im Lichtmikroskop glatt. Auf Elektronenaufnahmen (Abb. 22) sind im Gegensatz zu *Melosira distans* mehr oder weniger radial angeordnete Poren sichtbar. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man auch hier Siebe mit feinen Poren.

Die übereinandergreifenden Ränder der Halbzellen weisen eine der Längsachse der Zelle parallele Streifung auf, die sich in einzelne Punkte auflöst. Darüber ist dann ein bei *Melosira ambigua* besonders deutlicher Verdickungsring (Sulcus) vorhanden (Abb. 25).

Außen sind die Zellen auch hier von einer einfach gebauten, dünnen Haut umgeben, die annähernd gleich große, dicht gedrängte Poren von etwa 90 m μ Durchmesser aufweist (Abb. 23).

e) *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ.

Als letzter Vertreter der Gattung *Melosira* wurde *M. distans* untersucht. Die Art ist eine Kaltwasserform, die ihre optimale Entwicklung in Teichen und Seen der alpinen Region hat. Das Untersuchungsmaterial stammt aus einem der Kochelteiche des Riesengebirges. Abb. 26 ist eine Reproduktion aus HUSTEDT, 1930, S. 92.

Für diese Art ist die grobe Zeichnung der Diskusfläche charakteristisch (Abb. 27). Sie zeigt dichtstehende, große Poren, die unregelmäßige, nicht radiale Anordnung aufweisen (Abb. 28). Ihre Größe beträgt 0,6—0,9 μ . Sie sind ebenso wie bei den Mantelporen von *M. ambigua* durch eine kompliziert gebaute Siebplatte nach außen verschlossen. Die Mantelporen von *M. distans* sind in schrägen Längsreihen angeordnet und einfacher gebaut (Abb. 29). Ihr Durchmesser nimmt nach innen ab. Sie sind nach außen ebenfalls durch eine Siebplatte verschlossen, die im Durchschnitt 7—8 Siebporen aufweist.

Am Diskusrand befindet sich ein Kranz von Stacheln, der auch im Lichtmikroskop deutlich zu sehen ist (Abb. 26). Diese sind entweder eine Verlängerung von Teilen der Zellwand (Abb. 29), oder sie sind hohl. Im letzteren Falle sind es Röhren, die verlängerte Poren darstellen. Die Stachelenden sind infolgedessen unregelmäßig abgerundet oder abgebrochen (Abb. 30).

Abb. 26



Abb. 27



Abb. 28

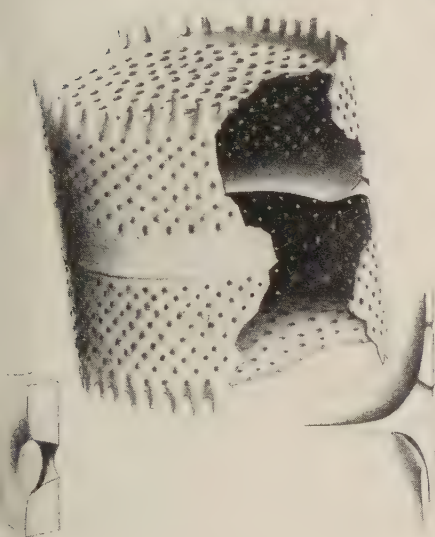
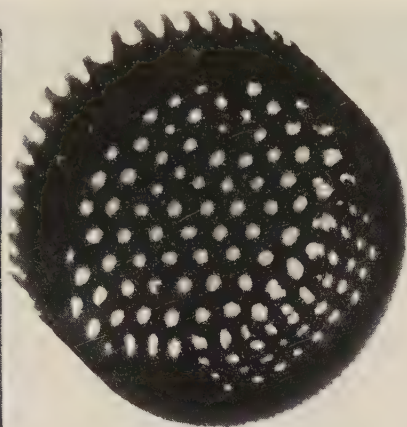


Abb. 29

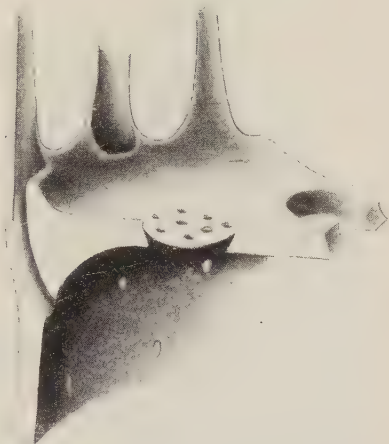


Abb. 30

Tafel IV

Abb. 26. *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ. (nach HUSTEDT) 750:1

Abb. 27. *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ. Maßstab 1000:1

Abb. 28. *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ. Diskus mit Randstacheln. Maßstab 3400:1

Abb. 29. *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ. Bau der Schale. (Schematische Rekonstruktionszeichnung: Kurt BOGEN; Photogrammetrische Ausmessung als Grundlage für diese Zeichnungen: Photogrammeter Hans RICHTER)

Abb. 30. *Melosira distans* (Ehrbg.) KÜTZ. Rekonstruktionszeichnung eines Bruchteiles der Schale (Kurt BOGEN)

In einiger Entfernung vom Mantelrande an der Stelle, die für gewöhnlich als Sulcus bezeichnet wird, befindet sich ein weit nach innen vorspringendes Diaphragma (Abb. 29). Es ist mindestens in einer Halbzelle vorhanden.

Die zarte Außenhülle, die bei den anderen Arten fast immer nachweisbar ist, konnte bei *M. distans* nicht so häufig beobachtet werden. Sie weist wenige, entfernt stehende, kleine Poren auf und scheint sich leicht abzulösen.

[Eingegangen am 26. Juni 1951]

Die Elektronenmikroskopie in der Sowjetunion

Zusammenfassendes Referat über die auf dem 1. Kongreß für Elektronenmikroskopie in Moskau vom 15.—19. Dezember 1950 vorgetragenen Berichte (Nachr. Akad. Wiss. UdSSR. phys. Serie 15, 1950, Heft 3 und 4).

Aus der Eröffnungsansprache von A. A. LEBJEDJEW geht hervor, daß in der Sowjetunion etwa 100 Elektronenmikroskope in Betrieb seien. Bei der Mehrzahl dürfte es sich um das elektromagnetische Mikroskop EM-3 für 50 kV handeln, welches als bisher einziges in Serienfabrikation gefertigt wird (seit 1949). Es sei eine Verbesserung des schon vor dem Kriege im Staatlichen Optischen Institut entwickelten Mikroskopes, mit welchem etwa zu Beginn des Krieges die ersten übermikroskopischen Aufnahmen gemacht und von dem 1946 die ersten fünf Exemplare fertiggestellt worden seien. Die elektronenmikroskopische Entwicklungsarbeit sei jetzt im wissenschaftlichen Forschungsinstitut des Ministeriums für Elektroindustrie zusammengefaßt, wo eine große elektronenmikroskopische Abteilung besteht. Partei und Regierung haben der Entwicklung der Elektronenmikroskopie unablässig wirksamste Hilfe angedeihen lassen.

Im ersten Bericht [1] wird ein neues elektromagnetisches 100 kV-Universalmikroskop (UEM-100) beschrieben (Abb. 1), welches im Gesamtaufbau und vielen Einzelteilen an das Siemens-Mikroskop nach RUSKA und v. BORRIES erinnert, diesem gegenüber aber doch einige Abweichungen hat. So besitzt es z. B. eine axial verstellbare Objektivblende, welche bis unmittelbar unter das Objekt herangeschoben werden kann, so daß Objektbereiche von der Größe der Objektivblendenöffnung ausgeblendet und dann durch Elektronenbeugung untersucht werden können. Die Justierung der Kondensorlinse geschieht durch einen von außen seitlich verschiebbaren Kondensorpolschuh; Objektivblende und Zwischenbildblende sind seitlich herausnehmbar, ohne daß die Mikroskopsäule auseinandergenommen werden muß. Als Hochvakuumpumpe dient ebenso wie bei den anderen neuen Typen eine Öldiffusionspumpe mit einer mechanischen Vorpumpe. Die Vergrößerung, deren Regelung durch das vom Siemens-Mikroskop bekannte Vierfachprojektiv geschieht, kann zwischen 200 und 25000 variiert werden, das Auflösungsvermögen wird für Durchstrahlungsaufnahmen mit 5—6 μ angegeben. Die Hochspannung kann in vier Stufen auf 40, 60, 80 und 100 kV eingeschaltet werden. Besondere Zusatzeinrichtungen für Stereo-, Emissions- [2] und Rückstrahlmikroskopie [3] zum UEM-100 werden beschrieben. Eine weitere für die Sowjetunion neue Konstruktion stellt das elektrostatische 40 kV-Mikroskop (ESM-40) dar [4] (Abb. 2). Das Gerät hat keinen Kondensor und keine Objekt- und Plattenschleusen. Der Objektisch trägt sechs Objekte, welche nacheinander ohne Unterbrechung des Vakuums in den Strahlengang gebracht werden können. Die elektronenoptische Vergrößerung beträgt 1000 bis 6000 bei einem Auflösungsvermögen von 8—10 μ . An diesem Gerät wurden Versuche mit einem elektrostatischen Hochspannungserzeuger nicht näher beschriebener Bauart durchgeführt, wobei ebenso gute Bilder erzielt worden sein sollen wie mit der üblichen Hochspannungserzeugung. Die hochfrequente Erzeugung und Stabilisierung von Hochspannung und Linsenströmen wird entwickelt [5], ist aber bei den Serien- und neuen Einzelmikroskopen noch nicht eingeführt. Ein Vakuumstand (WUP-1) zur Objektpräparation wird beschrieben [6]. Experimentelle und theoretische Untersuchungen über die optischen Eigenschaften magnetischer Linsen beschränken sich auf die Brennweiten der Linsen des UEM-100 [7] und die Untersuchung einer versuchsweise vor das Objektiv des UEM-100 gesetzten langbrennweitigen Vorlinse auf ihre Brechkraft und ihren Öffnungsfehler [8]. Eine allgemeine Theorie der elektronenoptischen Abbildung in beliebigen elektrostatischen Feldern wird gegeben und auf die praktisch interessantesten Fälle von a) rotationssymmetrischen Feldern, b) Feldern mit 2 Symmetrieebenen

und c) zweidimensionalen Feldern spezialisiert [24]. Theoretische Untersuchungen über die Elektronenstreuung in kleine Winkel und die darauf basierende Diskussion der Möglichkeit, Atome elektronenoptisch abzubilden, gründen sich auf die elastische Streuung am Thomas-Fermi-Modell [20, 21]. Ferner sind Untersuchungen über die für die Elektronenmikroskopie interessierenden Eigenschaften photographischer Platten sowjetischer Produktion durchgeführt worden [15, 16]. Unter den Arbeiten über die Anwendung des Elektronenmikroskops in Metallkunde und Chemie [9—14, 17—19, 22, 23, 25] nehmen Untersuchungen der Strukturveränderungen von Metallelektroden in Gasentladungen einen breiten Raum ein. Zuletzt wird über Versuche mit dem Feldelektronenmikroskop nach E. W. MÜLLER berichtet [26]. Als Forschungsaufgaben für die Zukunft setzt sich die sowjetische Gruppe die Schaffung billiger Kleinmikroskope, Verbesserung der Objektpräparationsverfahren, Feinstrahlbeugung, Geschwindigkeitsanalyse der unelastisch im Objekt gestreuten Elektronen und Untersuchung von Mikrofeldern.

In den Tagungsheften sind folgende Arbeiten enthalten:

- 1) N. G. SSUSCHKIN, A. G. PLACHOW, JU. M. KUSCHNIR, P. W. SAITZEW, A. R. BERTYN und N. P. LEWKIN, Ein Universal-Elektronenmikroskop für 100 kV (UEM-100), S. 285—293.
- 2) G. W. SPIWAK und A. M. ROSENFELD, Ein Emissions-Elektronenmikroskop hoher Auflösung, S. 317 bis 322.
- 3) JU. M. KUSCHNIR, L. M. BIBERMAN und N. P. LEWKIN, Ein Rückstrahl-Elektronenmikroskop (EM-100), S. 306—316.
- 4) W. I. MILUTIN, K. M. JANTSCHESKIJ, W. FETISSOW und K. K. RASPLETIN, Ein Elektronenmikroskop mit elektrostatischen Linsen (ESM-40), S. 294—304.
- 5) G. F. SACHAROW, W. W. POLIWANOW und JU. W. SOLOTARENKO, Elektrische Speisungsanlagen für Elektronenmikroskope, S. 323—335.
- 6) A. I. FRIMER und A. K. NEFEDOW, Eine Anlage zur elektronenmikroskopischen Präparation (WUP-1), S. 336—340.
- 7) A. G. PLACHOW, Experimentelle Untersuchung des Feldes starker magnetischer Linsen des Elektronenmikroskops, S. 347—354.
- 8) N. G. SSUSCHKIN und P. A. STOJANOW, Eine langbrennweitige Linse für das magnetische Elektronenmikroskop, S. 341—346.
- 9) D. S. SCHREIBER, Anwendung des Elektronenmikroskops für die Untersuchung der Metallstruktur, S. 355—357.
- 10) N. N. BUINOW und R. M. LERINMAN, Untersuchung der Anfangsstadien der Alterung von Legierungen auf Aluminiumbasis, S. 358—365.
- 11) P. W. HELD, N. N. BUINOW und R. M. LERINMAN, Untersuchung von Rauchniederschlägen von Siliziumoxyd mit Hilfe des Elektronenmikroskops, S. 366—372.

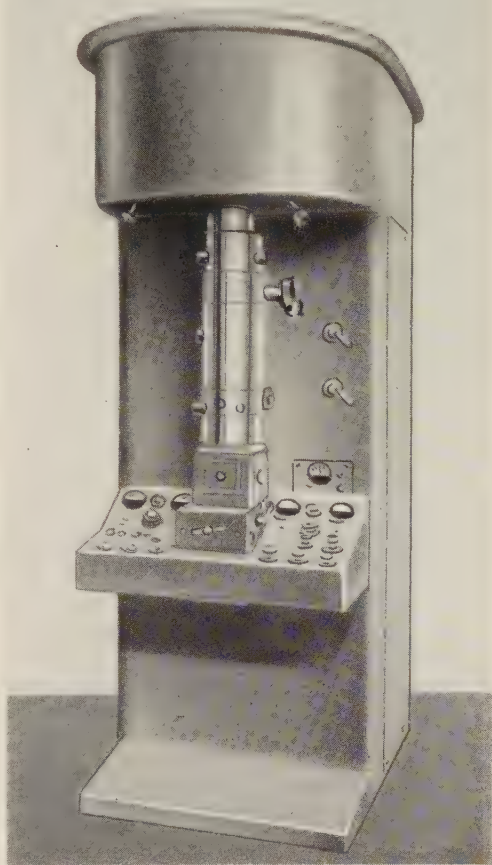


Abb. 1. Magnetisches Mikroskop für 100 kV (UEM-100)

- 12) L. S. PALATNIK, Die Aluminium-Polystyrolmethode zur Untersuchung von Legierungen im Elektronenmikroskop, S. 373—382.
- 13) M. W. JAKUTOWITSCH, E. S. JAKOWLEWA, R. M. LERINMAN und N. N. BUINOW, Untersuchung deformierter Aluminiumkristalle im Elektronenmikroskop, S. 383—386.
- 14) R. M. LERINMAN, W. D. SSADOWSKIJ und A. M. POLAKOWA, Untersuchung der Struktur von gehärtetem und angelassenem Stahl im Elektronenmikroskop, S. 387—392.

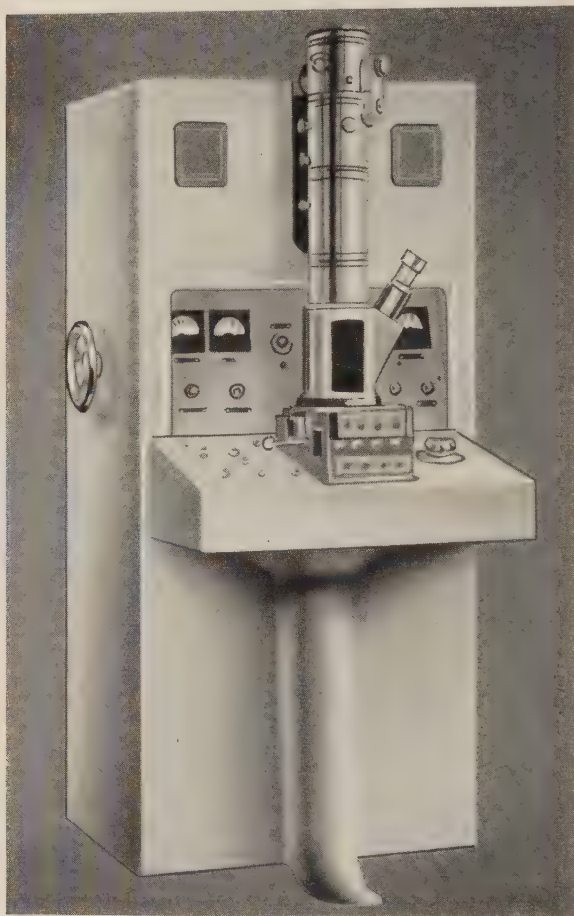


Abb. 2. Elektrostatistisches Mikroskop für 40 kV (ESM-40)

- 15) N. G. SSUSCHKIN, I. A. KOWNER und E. N. WTOROW, Elektronensensitivometrie, S. 395—402.
- 16) N. G. SSUSCHKIN und E. N. WTOROW, Das Auflösungsvermögen photographischer Emulsionen für Elektronenstrahlen, 403 bis 408.
- 17) G. W. SPIWAK, I. N. PRILESHAJEWA und E. A. GRUS, Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kathodenzerstäubungsprozesses, S. 409—412.
- 18) A. M. SCHEMAJEW, A. I. FRIMER und I. I. SSILWESTROWITSCH, Elektronenmikroskopische Untersuchung von der Einwirkung von Glimmentladungen ausgesetzten Elektrodenoberflächen, S. 413—417.
- 19) K. A. MITSCHURINA, I. N. PRILESHAJEWA und G. W. SPIWAK, Elektronenmikroskopische Untersuchung der Strukturveränderungen von Aluminium bei der Elektroerosion, S. 418—423.
- 20) L. M. BIBERMAN, Zur Theorie der Mehrfachstreuung von Elektronen, S. 424—428.
- 21) L. M. BIBERMAN, Über die Möglichkeit der Beobachtung von Atomen im Elektronenmikroskop, S. 429 bis 433.
- 22) G. W. SPIWAK und R. A. LUKATZKAJA, Elektronenmikroskopie kleiner Vergrößerung bei Anwesenheit eines Gases von Atmosphären- oder erniedrigtem Druck, S. 434—443.
- 23) N. D. MORGULISS und I. A. DERJUGIN, Über die Frage der elektronenoptischen Untersuchung von Oxydkathoden II, S. 444—447.
- 24) A. M. STRASCHKEWITSCH und I. M. PILAT, Die Aberration von Korpuskularstrahlenbündeln beliebiger Form in einem beliebigen elektrostatistichen Feld, S. 448—466.
- 25) L. S. PALATNIK, Umwandlungen in der Oberflächenschicht eines Metalls unter der Einwirkung elektrischer Entladungen, S. 467—471.
- 26) I. L. SSOKOLSKAJA, Untersuchung der Autoelektronenemission einer monokristallinen Spitze mit Hilfe des sphärischen Elektronenprojektors, S. 472—473.

F. Lenz

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. B. RAJEWSKY)

Elektronenmikroskopische Studien über micellare Strukturen bei Schmetterlingsschuppen vom Morpho-Typ

Von W. Lippert und K. Gentil

Die Schillerschuppen des Schmetterlings *Morpho achilles* sind schon Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen (1, 2, 3, 4, 5). Vor allem der Bau der auf der Unterseitenlamelle¹⁾ angeordneten Leisten wurde oft diskutiert. Eine merkwürdige Tatsache über den Aufbau der Schuppen ist aber bis jetzt relativ wenig beachtet worden: Es gelingt ziemlich leicht, die Leisten von der Unterseitenlamelle mechanisch zu trennen. Bei den sog. „glasklaren“ Schillerschuppen (bei denen die Querleisten sehr schwach ausgebildet sind) liegen die Längsleisten dann praktisch ohne Verletzung um 90° gedreht auf der Unterseitenlamelle (Abb. 1, rechte Seite). Dabei bleibt auf der Unterseitenlamelle oft nicht die geringste Spur von den Leisten bzw. Trabekeln zurück. Es ist also offenbar so, daß die Verbindungsstelle zwischen Trabekeln und Unterseitenlamelle mechanisch sehr schwach ist. Eine Erklärung drängt sich auf, wenn man ein schrägbedampftes Bild einer Schuppe sieht. Wie die Abb. 2 und 3b zeigen, enthält die Unterseitenlamelle faserartig verflochtene, längliche Micellen, die in ihrer Längsrichtung in die Lamellenebene orientiert sind. Ferner ist bei einigen Micellen eine relativ sehr regelmäßige Periodizität von etwa 55 m μ angedeutet. Ob diese wirklich eine Eigenschaft der einzelnen Micelle ist, oder ob sie durch das Übereinanderliegen mehrerer Micellen zustande kommt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Ohne Schrägbedampfung ist diese Struktur praktisch nicht zu erkennen, da die Lamelle zu dick ist und Oberflächenstrukturen durch Volumeninhomogenitäten überdeckt werden. Auf den Trabekeln der Leisten dagegen sind, wie die Abb. 2 und 3a erkennen lassen, die Micellen so angeordnet, daß sie im Fuß senkrecht zur Unterseitenlamelle verlaufen. Es ist nun leicht vorstellbar, daß sowohl das Fasernbündel des Trabekels als auch die Filzstruktur der Unterseitenlamelle in sich eine wesentlich größere Festigkeit besitzen als die Verbindungsstelle zwischen beiden.

¹⁾ Die Schmetterlingsschuppen sind Überreste von stark vergrößerten Epithelzellen. Es handelt sich i. a. um flache, hohle Gebilde sehr verschiedener Struktur und Größe. Die dem Flügel zugekehrte Fläche, die Unterseitenlamelle, ist meistens mehr oder weniger glatt und mechanisch relativ stabil, die Oberseitenlamelle besitzt oft regelmäßig angeordnete Leisten (Leisten), die meistens ungefähr in der Schuppenlängsachse (Längsleisten) oder auch quer dazu verlaufen (Querleisten). Oft weist die Oberseitenlamelle auch mehr oder weniger regelmäßig angeordnete Löcher verschiedener Größe auf. Zwischen der Ober- und Unterseitenlamelle befinden sich pfeilerartige Gebilde, die sog. Trabekeln. Bei den Morphoschuppen ist von der Oberseitenlamelle außer den Leisten nichts mehr zu erkennen. Die Leisten sitzen auf den Trabekeln auf der Unterseitenlamelle.

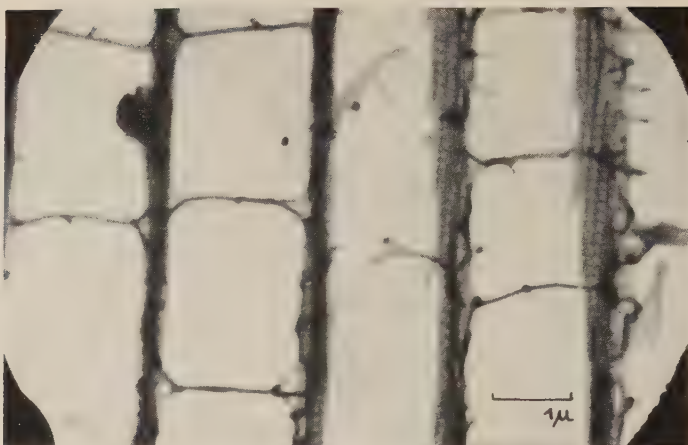


Abb. 1. Ausschnitt aus einer „glasklaren“ Schuppe von *Morpho achilles*, mit Leisten und Querleisten. Auf der rechten Seite sind die Querleisten umgelegt.
El. opt. Vergr.: 9 350 fach. Gesamtvergr.: 10 000 fach



Abb. 3a

Abb. 2. Glasklare Schuppe von *Morpho achilles*, mit Chrom schräg bedampft. Umgelegte Leisten, filzige Struktur der Unterseitenlamelle.
El. opt. Vergr.: 4 200 fach. Gesamtvergr.: 8 000 fach

Bei den „eigentlichen“ Schillerschuppen des *Morpho achilles* (die im Gegensatz zu den „glasklaren“ ein wesentlich stärkeres Leistensystem, dafür eine im allgemeinen schwächere Unterseitenlamelle besitzen), sind auch im normalen, nicht bedampften Präparat Micellen in der Unterseitenlamelle zu erkennen (Abb. 4).

In Abb. 3b erkennt man die Stellen, an denen die Leisten standen, daran, daß dort die Micellen klarer hervortreten (siehe Pfeile). Es hat den Anschein, daß an

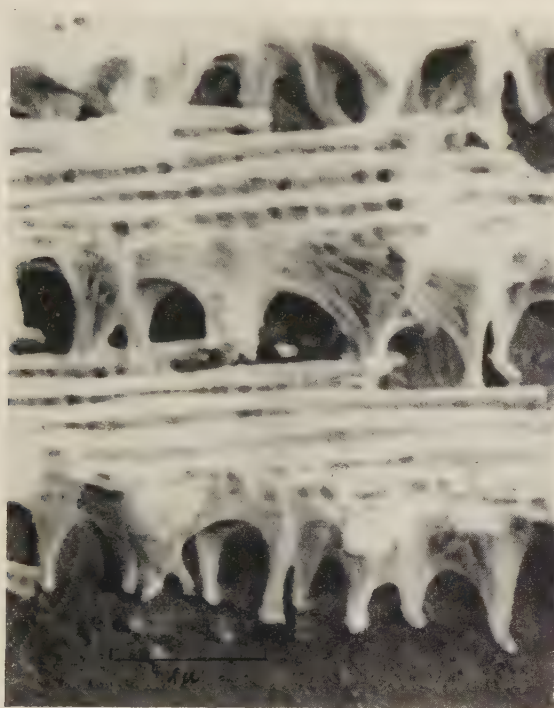


Abb. 3a. Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 2.
El. opt. Vergr.: 4 200fach Gesamtvergr.: 20 000fach

den Stellen, an denen sich keine Leisten befinden, eine sehr dünne, homogene Schicht über der eigentlichen Filzschicht liegt (Rest der Oberseitenlamelle?), so daß dort die Konturen der Micellen verschwommener erscheinen.

Bei den Schmetterlingsschuppen handelt es sich z. T. um Gebilde, die so dick sind, daß ihre Untersuchung im Elektronenmikroskop auf Schwierigkeiten stößt. Da die Zahl der Elektronen, die Geschwindigkeitsverluste im Objekt erlitten haben, bei solchen Objekten sehr groß ist, machen sich vor allem chromatistische Fehler bemerkbar, und zwar erwies sich vor allem die Abhängigkeit der Vergrößerung von der Elektronengeschwindigkeit als sehr störend. Es zeigte sich, daß dieser meistens nicht in Erscheinung tretende und deshalb kaum beachtete Fehler bei verschiedenen Geräten und den verschiedenen Einstellmöglichkeiten in sehr unterschiedlichem Maße auftritt.

Es ist damit mit Hilfe des Elektronenmikroskops gezeigt, daß, ähnlich wie z. B. Cellulose bei Bakterien und Tunicaten (8), auch bei Insekten die Gerüstsubstanz

in Form von Micellen ausfallen kann²⁾. Zwar wurde schon bei anderen, aus Chitin bestehenden Formen z. B. aus polarisationsoptischen Untersuchungen ein anisotroper Aufbau der Substanz erschlossen (9), die genaue Form, Größe und Lagerung der Micellen kann aber nur das Elektronenmikroskop liefern. Die Frage nach der genauen Zusammensetzung sowohl der Substanz der Micellen, als auch derjenigen der dünnen Deckschicht muß z. T. allerdings noch offen bleiben, da an sich vor-

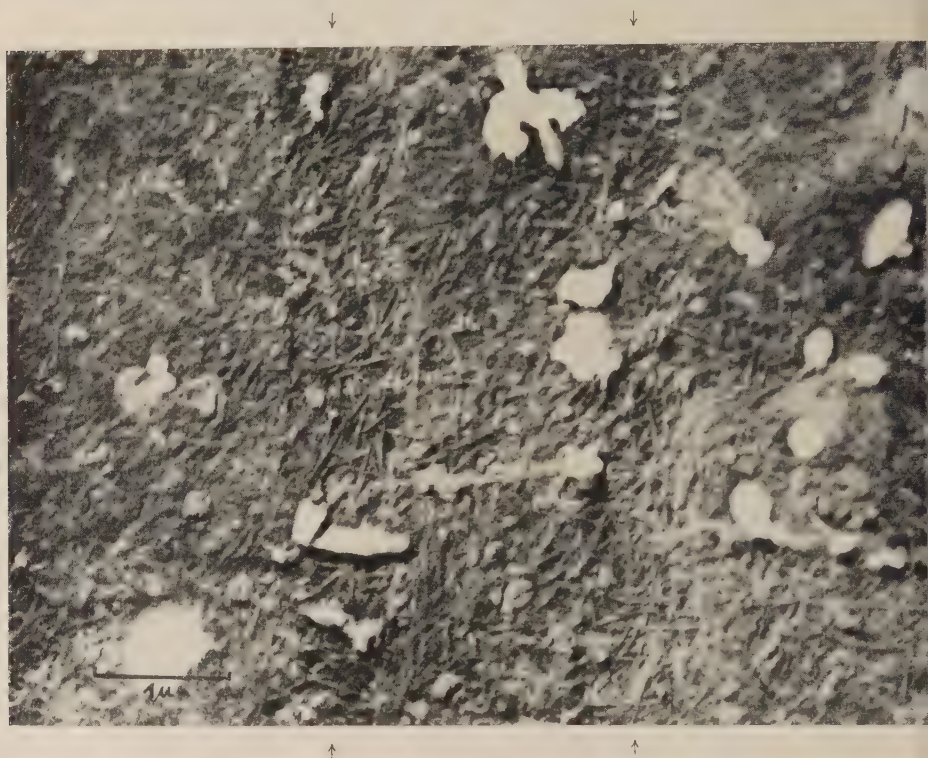


Abb. 3b. Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 2. Einzelne Micellen mit Andeutung einer Querstreifung von einer Periodenlänge von etwa 55 mμ. Die Pfeile geben die ehemalige Lage der Leisten an. El. opt. Vergr.: 4200 fach. Gesamtvergr.: 18 000 fach

bereitete Versuche aus äußeren Gründen (Defekt am Elektronenmikroskop) nicht durchgeführt werden konnten. Die oft, z. B. in (1, 5, 7) geäußerte, an sich nahe liegende Annahme, daß es sich um Chitin handelt, wurde von ANDERSON und RICHARDS (4) u. a. auf Grund chemischer Untersuchungen bezweifelt. Ähnlich den Cellulose-Micellen besitzen die Micellen dieser Schmetterlingsschuppen eine sehr große Längenausdehnung (bis zu einigen μ), die Breite liegt bei 20—50 mμ.

²⁾ Anm. bei der Korrektur: Wie den Verff. erst jetzt bekannt wird, haben A. FREY WYSSLING und K. MÜHLETHALER in der „Vierteljahresschrift der Naturf. Ges. in Zürich“ 95 45—52, 1950 den micellaren Aufbau von Chintinzellwänden bei Pilzen nachgewiesen.



Abb. 4. „Eigentliche“ Schillerschuppe von *Morpho achilles*. Rechts Leistensystem, links Leisten entfernt, in der Unterseitenlamelle sind micellare Strukturen sichtbar.
El. opt. Vergr.: 3 800 fach. Gesamtvergr.: 8 000 fach

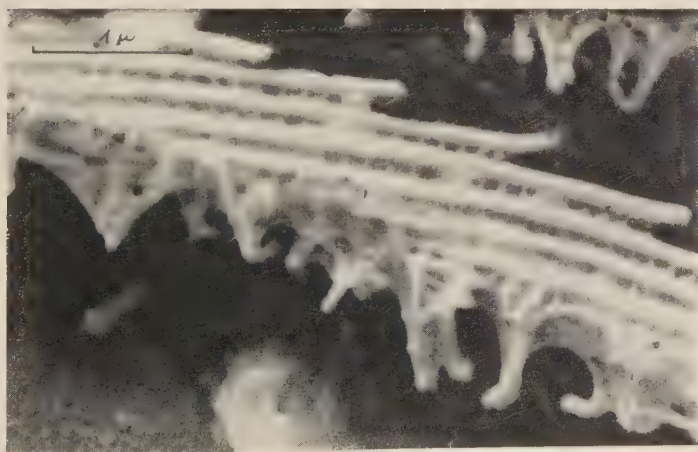


Abb. 5. Ausschnitt aus einer Leiste von einer „glasklaren“ Schuppe. Mit Chrom schräg bedampft, Bedampfungsrichtung senkrecht zu den Leistenstreben.
El. opt. Vergr.: 4 300 fach. Gesamtvergr.: 20 000 fach

Die Schrägbedampfung ist auch noch in anderer Hinsicht wichtig. Sie sichert und erweitert die von KINDER und SÜFFERT (5) ausgesprochenen Anschauungen über die Oberfläche der Leisten (Abb. 3 a u. 5). Die Bedampfungsrichtung bei Aufnahme 3 a liegt ungefähr in Richtung der Längsstreben, bei 5 senkrecht dazu). Die ungefähr in Richtung der Leisten verlaufenden Längsstreben stehen am weitesten aus der Leistenfläche hervor, aber auch die Querstreben heben sich deutlich von der die Leisten zusammenhaltenden Verstreibungsmembran ab. Es scheint ferner sogar gelegentlich vorzukommen, daß diese Verstreibungsmembran in den von Längs- und Querstreben gebildeten Vierecken fehlt. Über das Innere der Leiste lassen sich dagegen auf Grund der bisher gemachten Aufnahmen keine weitergehenden Aussagen machen.

Wenn auch über die Entstehung und den Bau der Schmetterlingsschuppen auch mit Hilfe des Elektronenmikroskops schon sehr viele wertvolle Erkenntnisse gewonnen wurden (6, 7), dürfte es künftig nicht unwesentlich sein, soweit es möglich ist, auch die micellare Feinstruktur zu berücksichtigen. Diese Feinstruktur muß einmal Rückschlüsse auf die Vorgänge bei der Entstehung der Micellen, außerdem auch auf die Art des mechanischen Aufbaus zulassen.

Schrifttum

- 1) F. SÜFFERT, Morphologie und Optik der Schmetterlingsschuppen, insbesondere die Schillerfarben der Schmetterlinge. *Z. Morph. u. Ökol. d. Tiere* **1**, 171—308, 1924.
- 2) K. GENTIL, Beiträge zur Kenntnis schillernder Schmetterlingsschuppen auf Grund polarisations-optischer Untersuchung. *Z. Morph. u. Ökol. d. Tiere* **37**, 591—612, 1941.
- 3) K. GENTIL, Elektronenmikroskopische Untersuchung des Feinbaus schillernder Leisten von Morpho-Schuppen. *Z. Morph. u. Ökol. d. Tiere* **38**, 344—355, 1942.
- 4) ANDERSON u. RICHARDS, An Electron Microscope Study of some structural colors of insects. *Journ. of Appl. Physics* Vol. 13 No. 12, 1942.
- 5) E. KINDER u. F. SÜFFERT, Über den Feinbau schillernder Schmetterlingsschuppen vom Morphotyp. *Biol. Zbl.* **63**, 268—288, 1943.
- 6) A. KÜHN, Konstruktionsprinzipien von Schmetterlingsschuppen nach elektronenoptischen Aufnahmen. *Z. f. Naturforschg.* **1**, 348—351, 1946.
- 7) A. KÜHN u. Melitta AN, Elektronenoptische Untersuchungen über den Bau von Schmetterlingsschuppen. *Biol. Zbl.* **65**, 30—40, 1946.
- 8) A. FREY-WYSSLING u. R. FREY, Tunicin im Elektronenmikroskop. *Protoplasma* **34**, 656—660, 1950.
- 9) W. J. SCHMIDT, Dichroitische Färbung tierischer und pflanzlicher Gewebe. *Handb. d. biol. Arbeitsmethoden* Abt. 5, Teil 2, 1825—1924, 1932. *Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben.* *Handb. d. biol. Arbeitsmethoden* Abt. V, Teil 10, 435—665, 1934.

[Eingegangen am 15. August 1951]

Aus dem¹Institut für Mikromorphologie der Deutschen Forschungshochschule Berlin-Dahlem
(Leitung: Prof. Dr. H. RUSKA)

Einige licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Malleomyces mallei* (Pribram)

Von **Günter P. K. Schuster**

Zusammenfassung

Es wird die Morphologie des Rotzerregers (*Malleomyces mallei*) beschrieben. Bakterien aus jungen Kulturen von Glycerinagar ließen Zytoplasmalücken erkennen, die als Flüssigkeitsvakuolen zu deuten sein dürften. Auf phosphatreichem Stärke-Glycerinagar bilden die Zellen Granula, die auf Grund der charakteristischen Reaktionen als Phosphatbegleitkörper der Karyoide (4) angesehen werden. Die bei *Mycobakterium avium* beobachteten plasmatischen Lipoidvakuolen scheinen bei *Malleomyces mallei* nicht aufzutreten.

I. Einführung

Der Rotzerreger ist bis heute kaum Gegenstand eingehender morphologischer Untersuchungen gewesen. Der Grund hierfür dürfte in seiner hohen Infektiosität zu suchen sein, die in fast allen Fällen zu Laboratoriumsinfektionen mit tödlichem Ausgang geführt hat. Die einzigen elektronenoptischen Bilder, die uns bekannt geworden sind, stammen von MILLER und Mitarbeitern (1), die jedoch ihr Hauptaugenmerk auf die Physiologie warfen.

Ebenso wie bei den Coryne- und Mycobakterien sind in den Rotzbazillen Partien des Zelleibes beschrieben worden, die sich mit den üblichen Bakterienfarbstoffen stärker anfärben als dazwischenliegende Abschnitte. Auf Grund unserer Untersuchungen an Geflügeltuberkelbazillen (2) und einer älteren, aber oft noch jetzt vertretenen Ansicht, daß der Rotzerreger im System den Tuberkelbazillen nahe stände, erschien es uns gerechtfertigt, die nachstehenden Untersuchungen vorzunehmen.

II. Material und Methoden

Es standen uns vier Malleusstämmen zur Verfügung, von denen nach einigen vergleichenden Untersuchungen derjenige mit dem schnellsten Wachstum aus- gesucht wurde. Als Nährboden kamen 2%iger Glycerinagar zur Verwendung und phosphatreicher Stärke-Glycerinagar folgender Zusammensetzung:

Stärke-Glycerinagar: 100 ccm 2%igem Glycerinagar werden 2 g Kartoffel- stärke, 1,5 g sekundäres Natriumphosphat und 1 ccm Löfflers Methylenblau zu- gegeben (p_H 7,0). Die Methylenblaulösung darf erst beigemischt werden, nachdem sich der Agar auf etwa 60° C abgekühlt hat. Sie hat den Zweck, junge Kolonien besser erkennen zu lassen.

Zur elektronenoptischen Untersuchung wurden die Bakterien aus Aufschwemmungen auf befilmte Platinblenden aufgebracht und danach mit den Dämpfen von 40%igem Formalin oder in der Hitze trocken bei 100° C fixiert. Die Beobachtung erfolgte mit dem Siemens Übermikroskop (Typ ÜM 100b) bei 80, bzw. 100 kV Beschleunigungsspannung.

III. Eigene Beobachtungen

Im Lichtmikroskop erscheint der Rotzbazillus in Organausstrichen als ein ziemlich langes, an den Enden abgerundetes Stäbchen. Einzelheiten sind ungefärbt nicht zu erkennen. Erst nach der Färbung, besonders mit Giemsalösung, kann man dunklere Zellpartien von weniger stark angefärbten unterscheiden. Das Bild erinnert an Diphtherie- und Tuberkelbazillen. Oft fällt eine Bänderung des Bazillenleibes auf, wie man sie besonders bei den nach GRAM gefärbten Diphtheriebakterien häufig beobachtet.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden ausschließlich Zellen aus Kulturen verwendet, da es in Kulturen einfacher ist, gleiche Bedingungen für das Wachstum zu schaffen, jegliche schädigende Antikörperwirkung auszuschalten und außerdem die Verunreinigungen mit Organresten zu vermeiden, die die Beobachtung im Elektronenmikroskop erschweren.

In den Stäbchen aus zwei Tage alten Glycerinagarkulturen, die sich bei der Auftrocknung oft zu Gruppen zusammenschließen, sieht man leicht durchstrahlbare, ovale bis runde Gebilde, die oft in solcher Menge vorhanden sind, daß das Zytoplasma an vielen Stellen durchlöchert erscheint (Abb. 1). Lichtmikroskopisch sind auch nach der Färbung mit Giemsalösung und mit dem Phasenkontrastmikroskop keine Strukturen zu erkennen, die man mit diesen Gebilden identifizieren könnte. Die Bazillen erscheinen vollkommen homogen.

Nach der Metallbedampfung (Abb. 2) und mit Hilfe der Stereoskopie konnte man deutlich erkennen, daß es sich um Vertiefungen im Bakterienleib handelt, die von der Zellmembran ausgekleidet sind. Wir vermuten, daß Vakuolen vorliegen, deren flüchtiger Inhalt bei der Auftrocknung auf die Trägerfolie oder beim Einschleusen in das Hochvakuum verdampft ist. Die Größe der Gebilde schwankt zwischen 30 und 150 μ . Allein daraus geht hervor, daß sie bisher lichtmikroskopisch nicht beobachtet wurden. Auch die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung mit Auramin an hitzefixierten Zellen ließ keine Einzelheiten erkennen.

Wenn die Kulturen älter als vier Tage sind, treten in den inzwischen meist zu längeren Fäden ausgewachsenen Zellen unscharf begrenzte substanzreichere Zell-

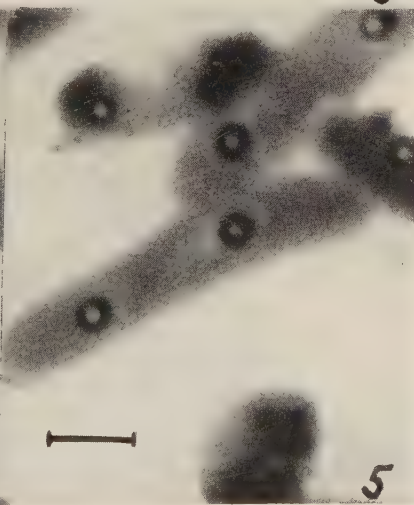
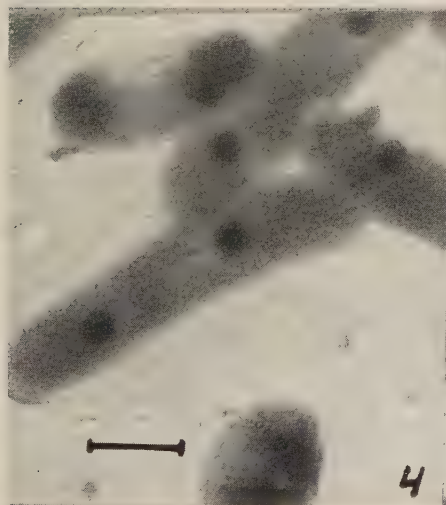
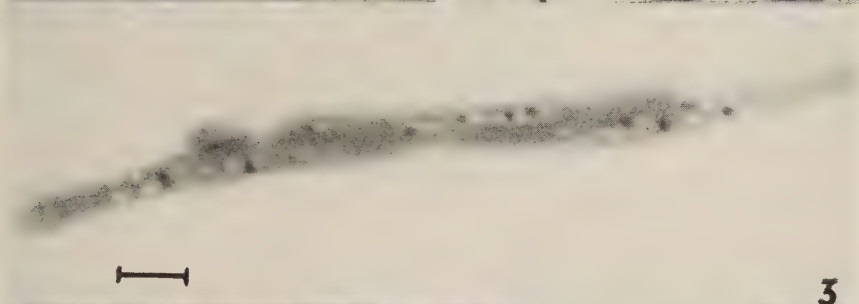
Abb. 1. Rotzbakterien aus einer 2tägigen Glycerinagarkultur. El. opt. 80 kV, 12000:1.

Abb. 2. Dieselben Bakterien nach der Bedampfung mit Wolframoxyd, Winkel: 30°. El. opt. 100 kV, 12000:1

Abb. 3. Bakterien aus zwei Tage alter Stärkeglycerinagarkultur, Vakuolen und beginnende Metaphosphateinlagerung. El. opt. 80 kV, 9000:1

Abb. 4. Voll ausgebildete Granula in 4 Tage gewachsenen Bakterien von Stärkeglycerinagar. El. opt. 80 kV, 12000:1

Abb. 5. Dasselbe nach der Zerstörung. El. opt. 100 kV, 12000:1



bezirke auf, zwischen welchen fast leere Abschnitte liegen. Entsprechend fällt die Giemsa-Färbung der meisten Zellen nicht mehr homogen aus. Die umschriebenen Zytoplasmalücken (Vakuolen) fehlen.

Da wir zunächst ausschließlich Glycerinagar für unsere Versuche verwendet hatten und bekannt ist, daß die Granulabildung der Tuberkelbakterien auf Glycerinagar erst nach Zusatz von Phosphaten zustandekommt, versuchten wir, die Granulabildung bei Rotzbakterien auf dieselbe Weise hervorzurufen.

Unter den Rotzbazillen, die auf einem phosphatreichen Stärke-Glycerinagar bei 37° C drei Tage gezüchtet wurden, waren im lichtmikroskopischen Präparat fast keine strukturlosen Zellen zu sehen. Nach Much- und HCl-Giemsa-Färbung (5 Min. Hydrolyse) zeigten sich in den Zellen reichlich Granula. Im Elektronenmikroskop waren fast in allen Zellen scharf begrenzte Gebilde zu erkennen, die bei starker Bestrahlung ähnlich wie die Granula der Tuberkelbazillen zerstört wurden (Abb. 4). Wir prüften deshalb, ob es sich hier um die gleichen Gebilde handelt, die aus Phosphaten und Nukleinsäuresystemen bestehen (2, 3, 4).

Färberisch konnte durch Toluidinblau der Nachweis von Metaphosphaten erbracht werden. Nach 30 Minuten Extraktion in Carnoyschem Gemisch (H_2SO_4 statt HCl) waren sowohl bei der Beobachtung im Elektronenmikroskop als auch im Lichtmikroskop die Phosphat-Granula aus den Bakterien herausgelöst. Es konnten jedoch mit der HCl-Giemsa-Färbung und der Feulgenreaktion noch Nukleinsäuren an den Stellen nachgewiesen werden, die ursprünglich auch Phosphate enthielten.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Mit unseren Versuchen glauben wir, den Nachweis erbracht zu haben, daß es sich bei den in den Rotzbazillen sichtbaren phosphathaltigen Granula um die zytochemisch und damit auch physiologisch gleichen Organellen handelt, die in den Diphtherie- (3) und Tuberkelbazillen (1) als Karyoidstadien der Kernäquivalente (BRINGMANN) beschrieben wurden. Lipoidvakuolen, wie wir sie in den Tuberkelbazillen sahen, konnten wir auch in älteren Kulturen nicht finden.

WORLEY und YOUNG (5) gelang es, färberisch Fette nachzuweisen, was wir lichtmikroskopisch bestätigen konnten. Wahrscheinlich werden die Lipoide in der Zelle nicht so stark angereichert, daß wie bei den Tuberkelbazillen eine Entmischung eintritt, durch die Lipoidvakuolen im Zytoplasma sichtbar werden. Unsere Befunde decken sich im wesentlichen mit denjenigen von MILLER und Mitarbeitern, die jedoch keine Versuche zur zytologischen und zytochemischen Deutung durchführten. Sie beobachteten auch die von uns an Zellen aus jungen Kulturen beschriebenen Vakuolen. Ähnliche Gebilde sahen PETERS und WEYER (6) an Rickettsien, sowie RAETTIG und H. RUSKA (7) an Ruhrbakterien aus jungen Kulturen. PETERS und WEYER vermuten auf Grund von Modellversuchen, daß im Bereich der Aufhellungen Retikulärkolloide im Sinne FREY-WYSSLINGS in das Zytoplasma eingelagert sind. Sie konnten an Rickettsien zeigen, daß die Aufhellungen sich als warzenartige Erhöhungen darstellen lassen, wenn die Metall-

edampfung an Objekten stattfindet, die nicht vorher schon unbedampft elektronenmikroskopisch untersucht wurden. An Rotzbakterien ist uns dies nicht gelungen.

Fräulein I. DIETRICH danke ich für ihre Hilfe bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate, Herrn Professor H. RUSKA für seine ständige Beratung und die Ausbildung in der elektronenmikroskopischen Technik. Für die Überlassung der Stämme und seine ständige Hilfe bin ich Herrn Dr. med. vet. J. ZURECK vom Veterinäruntersuchungsamt Berlin-Dahlem zu größtem Dank verpflichtet.

Schrifttum

-) MILLER, W. R., L. PANNELL, L. CRAVITZ, W. A. TANNER and M. S. INGALIS: J. of Bact **55**, S. 115, 1948.
-) RUSKA, H., G. BRINGMANN, I. NÆCKEL und G. SCHUSTER: Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie Bd. **60**, 6/7 S. 425, 1952.
-) BRINGMANN, G.: Planta **38** S. 541, 1950.
-) Ders.: Zbl. Bakt. I. Orig. 156, S. 493, 1951.
-) WORLEY G. and G. YOUNG: J. of Bact. **49**, S. 97, 1945.
-) PETERS, D., und F. WEYER: Physikal. Verhandlungen 4, S. 81, 1951.
-) RUSKA, H., und H. RAETTIG, unveröffentlicht.

[Eingegangen am 17. Oktober 1951]

Schrifttum der Elektronenmikroskopie

(3. Folge)

Herausgegeben von **B. v. Borries** und **H. Ruska**

A. Theorie der elektronischen Abbildung

A 1. Theorie der Linsen und Ablenkfelder einschließlich ihrer Fehler

1118. *Kato, N.*: Die Bildfehler des Elektronenmikroskopes. *Electrotechn. J. (Japan)* 4, 219—222 (1940).
1119. *Rose, A.*: Electron optics of cylindrical electric and magnetic fields. *Proc. Inst. Radio Engr.* 28, 30 (1940).
1120. *Straschkewitsch, A. M.*: Elektrische Elektronenzylinderlinsen. *J. Phys. UdSSR.* 3, 507—523 (1940).
1121. *Hillier, J.*: The electron optics of the electron microscope. *J. Bact.* 41, 259 (1941).
1122. *Kato, N., und Inoue, T.*: Discussion about the aberration formula of geometrical electron optics. *Electrotechn. J. (Japan)* 5, 68 (1941).
1123. *Mac Coll, L. A.*: Trajectories of monoenergetic electrons, in an arbitrary static electromagnetic field, in the neighbourhood of a given trajectory. *J. Math. and Phys.* 20, 355 (1941).
1124. *Selenyi, P.*: Space charge current theory and the mechanical impulse of the electrons. *Physica* 8, 885 (1941).
1125. *Spangenberg, K.*: Use of the action to obtain the general differential equations of space charge flow in more than one dimension. *J. Frank. Inst.* 232, 365 (1941).
1126. *Grünberg, G. A.*: Allgemeine Theorie der Fokussierungswirkung elektrostatischer Felder. I. Zweidimensionale Felder; II. Dreidimensionale elektrostatische Felder; III. Dreidimensionale gekreuzte Felder. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR.* I) 37, 172 (1942); II) 37, 261 (1942) und III) 38, 78 (1943).
1127. *Svartholm, N.*: Calculation of magnetic lenses with a given field distribution. *Ark. Mat. Astr. Fys.* 28 B, No. 16, Sept. 1942.
1128. *Amaldi, E.*: Electronic lenses. *Riv. Nuovo Cim.* 1, 1 (1943).
1129. *Bruck, H.*: Sur les propriétés de quelques lentilles électrostatiques indépendantes. *Cahiers de Physique* 24, 15—28 (1944).
1130. *Coggeshall, N. D., und Muskat, M.*: The paths of ions and electrons in non-uniform magnetic fields. *Phys. Rev.* 66, 187 (1944).
1131. *Durand, E.*: Berechnung des Feldes einer bewegten elektrischen Ladung. *C. R. Acad. Sci., Paris* 219, 584 (1944).
1132. *Reimann, A. L.*: Potential topography in electronics. *Aust. J. Sci.* 7, 44 (1944).
1133. *Spangenberg, K., und Field, L. M.*: Electrostatic electron lenses. *Nature* 153, 441—442 (1944).
1134. *Wlassow, A. G.*: Die magnetische Linse mit kleinstem Öffnungsfehler. *Nachr. Akad. Wiss. UdSSR., physikal. Serie* 8, 235 (1944).
1135. *Wlassow, A. G.*: Berechnung der Feldverteilung in einfachen elektrostatischen Linsen. *Nachr. Akad. Wiss. UdSSR., physikal. Serie* 8, 240 (1944).
1136. *Chanson, P., und andere*: Bestimmung der Elemente erster Ordnung von symmetrischen elektrostatischen Linsen. *C. R. Acad. Sci. Paris* 221, 233—235 (1945).
1137. *Coggeshall, N. D.*: The paths of ions and electrons in crossed, non uniform electric and magnetic fields. *Amer. Phys. Soc.* 1945.
1138. *Hill, R. D.*: Potential distributions of equal coaxial cylinders. *J. Sci. Instr.* 22, 221 (1945).
1139. *Chanson, P.*: Optische Eigenschaften elektrostatischer Linsen. *L'Optique Électronique, Éd. L. de Broglie, Éditions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale, Paris, S. 85* (1946).
1140. *Coggeshall, N. D.*: Electron paths in crossed fields. *Physic. Rev.* 70, 270 (1946).

141. *Ertaud, A.*: Der rheographische Trog und die Berechnung elektrostatischer Linsen. *L'Optique Electronique*, Ed. L. de Broglie, Editions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale, Paris, S. 105 (1946).
142. *Loeb, J.*: Anordnung zur Veranschaulichung der Bahn eines geladenen Teilchens im Magnetfeld. *C. R. Acad. Sci. Paris* 222, 488 (1946).
143. *Motz, H.*, und *Klanfer, L.*: Complete computation of electron optical systems. *Proc. physic. Soc. (London)* 58, 30 (1946).
144. *Parkins, W. E.*, und *Crittenden, E. C. Jr.*: A graphical method for determining particle trajectories. *J. appl. Phys.* 17, 447 (1946).
145. *Cazalas, A.*: Experimentelle Bestimmung von Astigmatismus und Brennflächen in der Elektronenoptik. *C. R. Acad. Sci. Paris* 225, 178 (1947).
146. *Chanson, P.*: Optik elektrostatischer Linsen und das Protonenmikroskop. *Ann. Phys. Paris (Ser. 12)* 2, 333 (1947).
147. *Grafunder, W.*: A simple instrument for drawing electron paths in a potential field. *Bull. Ass. Suisse Electr.* 38, 79 (1947).
148. *Hutter, R. G. E.*: Electron beam deflection. I. Small-angle deflection theory. II. Applications of the small-angle deflection theory. *J. appl. Phys.* 18, 740 (1947).
149. *Jacob, L.*: Oil-drop method for electron trajectories. *Nature* 159, 475 (1947).
150. *Lafferty, J. M.*: Electron reflectors with a quadratic axial potential distribution. *Proc. Inst. Radio Engrs.* 35, 778 (1947).
151. *Laplume, J.*: Die relativistische Behandlung von Elektronenlinsen. *Cah. Phys.* 29/30, S. 1 (1947).
152. *Melkich, A.*: Ausgezeichnete astigmatische Systeme der Elektronenoptik, I. und II. *S. B. Akad. Wiss. Wien*, 155 Abt. IIa 393—470 (1947).
153. *Musson-Genon, R.*: The application of rheographic methods to the study of plane electron trajectories, taking account of space charge. *Ann. Telecommun.* 2, 254 und 298 (1947).
154. *Sseman, O. I.*: Aberration und Auflösungsvermögen einer „sphärischen“ Elektronenlinse. *J. techn. Phys. Ud.-SSR*, 16, 291 (1947).
155. *Svartholm, N.*: The focal length of a long magnetic lens. *Ark. Mat. Astr. Fys.* 35 A, 9 (1947).
1156. *Wendt, G.*: Zur Theorie der Ablenkfelder von Elektronenstrahlbündeln, insbesondere in gekreuzten Ablenkfeldern. *Ann. Physik.* 1, 83—94 (1947).
1157. *Bruck, H.*, *Remillon, R.*, und *Romani, L.*: Die Aberrationen eines elektrostatischen Objektives infolge ovaler Bohrung. *C. R. Acad. Sci. Paris* 226, 650 (1948).
1158. *Liebmann, G.*: Electrostatic field distribution near a circular aperture or short cylinder. *Phil. Mag.* 39, 281 (1948).
1159. *Marvaud, J.*: Automatische Anordnung zur Bestimmung von Elektronenbahnen. *C. R. Acad. Sci. Paris* 226, 476 (1948).
1160. *Rütte, W. A. Le.*: Chromatic aberration of electrostatic lenses. *Nature* 161, 392 (1948).
1161. *Bertein, F.*, und *Regenstreif, E.*: Emploi des rayons marginaux dans l'étude des dissymétries chez les lentilles électrostatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 228, 1854—1856 (1949).
1162. *Cotté, M.*: Potentiel et champ d'une électrode plane percée d'un trou elliptique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 228, 377 (1949).
1163. *Ehrenberg, W.*, und *Siday, R. E.*: Refractive index in electron optics and the principles of dynamics. *Proc. physic. Soc. B.* 62, 8—21 (1949).
1164. *Hall, C. E.*: Method of measuring spherical aberration of an electronmicroscopic objective. *J. appl. Phys.* 20, 631 bis 632 (1949).
1165. *Heise, F.*: Bestimmung von Verzeichnung und Öffnungsfehler elektrostatischer Linsen aus Hauptflächen und Brennpunkt-Hilfsflächen. *Optik* 5, 479 bis 489 (1949).
1166. *Ramberg, E. G.*: Aberration correction with electron mirrors. *J. appl. Phys.* 20, 183—186 (1949).
1167. *Scherzer, O.*: Sphärische Korrektur mit Hilfe eines astigmatischen Zwischenbildes. *Optik* 5, 497—498 (1949).
1168. *Bas-Taymaz, E.*: Remark on an aberration-phenomenon in electrostatic lenses. „Kidney Effect“. *J. appl. Phys.* 21, 1064 (1950).
1169. *Castaing, R.*: Une méthode de détection et de mesure de l'astigmatisme d'ellipticité. *C. R. Acad. Sci. Paris* 231, 835—837 (1950).
1170. *Castaing, R.*: Détection et mesure directe de l'astigmatisme d'ellipticité d'une lentille électronique. *C. R. l'Acad. Sci. Paris* 231, 894—896 (1950).

1171. *Funk, P.*: Über das Newtonsche Abbildungsgesetz in der Elektronenoptik. *Acta Phys. Austriaca* 4, 304–305 (1950).
1172. *Gabor, D.*: Electron optics at high frequencies and at relativistic velocities. *Rev. d'Optique* 29, 209–231 (1950).
1173. *Gianola, U. F.*: Reduction of the spherical aberration of magnetic electron lenses. *Proc. physic. Soc. (London)* B, 63, 703–708 (1950).
1174. *Gianola, U. F.*: The correction of the spherical aberration of electron lenses using a correcting foil element. *Proc. physic. Soc. B. (London)*, 63, 1037 bis 1039 (1950).
1175. *Glaser, W.*, und *Bergmann, O.*: Über die Tragweite der Begriffe „Brennpunkte“ und „Brennweite“ in der Elektronenoptik und die starken Elektronenlinsen mit Newtonscher Abbildungsgleichung. *Z. f. angew. Math. und Physik* 1, 363–379 (1950).
1176. *Glaser, W.*: The refractive index of electron optics and its connection with the Routhian function. *Proc. Physic. Soc. B, (London)* 64, 114 (1950).
1177. *Grivet, P.*: Sur l'extension de la formule de Lagrange-Helmholtz au domaine du troisième ordre. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 230, 1152–1154 (1950).
1178. *Grivet, P.*: Electron lenses. Im Buch von L. Marton: „Advances in Electronics“ Bd. 2, 48–100 (1950) New York.
1179. *Grivet, P.*, *Bertein, F.*, und *Regenstreif, E.*: The use of marginal rays for the study of asymmetry in electrostatic lenses. *Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949*, S. 86–88 (1950).
1180. *Kanaya, K.*: Die Aberration in magnetischen Linsen vom Glockenfeldtyp bei verschiedenen Unsymmetriegraden. *J. Electr. Micr. Japan* 1, 119–122 (1950).
1181. *Kassjankow, P. P.*: Berechnung der Bildfehler elektrostatischer Linsen mittels der Berechnung von Elektronenbahnen. *J. techn. Phys. UdSSR*, 20, 483 (1950).
1182. *Kassjankow, P. P.*: Bedingungen für die Kompensation des Astigmatismus und der Bildverzeichnung im Übermikroskop. *J. techn. Phys. UdSSR*, 20, 1426–1434 (1950).
1183. *Laplume, J.*: Elektronenlinsen in relativistischer Mechanik. *Rev. Opt. (Théor. Instr.)* 29, 106 (1950).
1184. *Lenz, F.*: Berechnung optischer Kenngrößen magnetischer Elektronenlinsen aus Polschuhabmessungen und Betriebsdaten. *Z. f. angew. Physik* 2, 448–453 (1950).
1185. *Lenz, F.*: Berechnung der Feldverteilung längs der Achse magnetischer Elektronenlinsen aus Polschuhabmessungen und Durchflutung. 2. Mitt. über die Berechnung optischer Kenngrößen magnetischer Elektronenlinsen. *Optik* 7, 243–253 (1950).
1186. *Lenz, F.*: Annäherung von rotations-symmetrischen Potentialfeldern mit zylindrischen Äquipotentialflächen durch eine analytische Funktion. *Ann. Physik* 8, 124–128 (1950).
1187. *Liebmman, G.*: Improved investigation methods for electron lenses. *Proc. of Conference on Electron Microscopy, Delft 1949*, 73–77 (1950).
1188. *Liebmman, G.*: A method for the mapping of vector potential distributions in axially symmetrical systems. *Philosoph. Magazine* 41, 1143–1151 (1950).
1189. *Liebmman, G.*: Field plotting and ray tracing in electron optics. A review of numerical methods. Im Buch von L. Marton „Advances in electronics“ Bd. 2, New York 1950, S. 101–149.
1190. *Maréchal, A.*: Mechanical integrator for studying the distribution of light in the optical image. *Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949*, S. 78–80 (1950).
1191. *Le Poole, J. B.*, und *Le Rütte, A. W.*: Correction and detection of astigmatism. *Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949*, S. 84–85 (1950).
1192. *Poeverlein, H.*: Über Wellen in anisotropen Ausbreitungsverhältnissen. *Z. f. Naturforsch.* 5a, 492–499 (1950).
1193. *Rabin, N. M.*, und *Straschkewitsch, A. M.*: Die Bahnen durch ein elektrostatisches Feld um geringe Winkel abgelenkter geladener Teilchen. *J. techn. Phys. UdSSR*, 20, 1232–1240 (1950).
1194. *Regenstreif, E.*: Hauptstrahlen eines Linsen- oder Spiegelsystems für Elektronen. *C. R. Acad. Sci. Paris* 230, 1262–1264 (1950).
1195. *Revell, R. S. M.*, und *Agar, A. W.*: Focusing in electron microscopy. *J. Sci. Instr.* 27, 337 (1950).
1196. *Sseman, O. I.*: Die Brechkraft kurzer Elektronenlinsen. *J. techn. Phys. UdSSR*, 20, 1180–1193 (1950).
1197. *Shinohara, K.*, und *Ryu, N.*: Polarization of electrons. *J. Physic. Soc. Japan* 5, 119–124 (1950).

198. *Sturrock, P. A.*: Note on the focusing of electron beams in certain magnetic fields. Proc. Phys. Soc. (London) B 63, 954—957 (1950).
199. *Sturrock, P. A.*: The aberrations of magnetic electron lenses due to asymmetries. Proc. Conference Electron Microscopy, Delft 1949, S. 89—93 (1950).
200. *Bernard, M.*: Sur un modèle de potentiel permettant l'étude de la lentille à trois électrodes. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 1439—1440 (1951).
201. *Bernard, M.*: Le potentiel axial des lentilles à grille. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 298—299 (1951).
202. *Bernard, M.*: Éléments gaussiens des lentilles à grille. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 1354—1356 (1951).
203. *Bertein, F.*: Sur les propriétés générales des lentilles électroniques faibles. La première approximation. Le Journal de Physique et le Radium 12, 595—601 (1951).
204. *Bertein, F.*: Étude des lentilles faibles électrostatiques: la deuxième approximation. Le Journal de Physique et le Radium 12, 25 A—31 A (1951).
205. *Boersch, H.*: Über die Gültigkeit des Babinet'schen Theorems. Z. f. Physik 131, 78—81 (1951).
206. *Gabowitsch, M. D.*: Berechnung der optimalen Fokussierung eines Strahles durch eine Elektronenlinse unter Berücksichtigung der Raumladung. J. techn. Phys. UdSSR. 21, 361—368 (1951).
207. *George, D. E., Hutter, R. G. E., und Cooperstein, M.*: The rotating beam method for investigating electron lenses. Sylv. Techn. 4, 41—43 (1951).
208. *Glaser, W., und Bergmann, O.*: Über die Tragweite der Begriffe „Brennpunkte“ und „Brennweite“ in der Elektronenoptik und die starken Elektronenlinsen mit Newtonscher Abbildungsgleichung. 2. Mitteilung. Z. f. angew. Mathem. und Phys. 2, 159—188 (1951).
209. *Glaser, W., und Lenz, F.*: Berechnung der elektronenoptischen Abbildung durch drei typische, starke Magnetlinsen und ihr Zusammenhang mit der gewöhnlichen Linsengleichung. Ann. Physik. 9, 19—28 (1951).
210. *Gómez García, J. A.*: Contribution to the study of a cylindrical electro-magnetic lens. An. Real. Soc. Eso. Fis. y Quim. 47, 15—28 (1951).
211. *Grivet, P., und Bernard, M.*: Éléments gaussiens dans la lentille électrostatique formée de deux cylindres coaxiaux de même diamètre. C. R. Acad. Sci. Paris. 233, 788 bis 792 (1951).
212. *Grivet, P.*: Un nouveau modèle mathématique de lentille électronique. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 921—923 (1951).
213. *Himpan, J.*: Elektronenoptische Theorie der Ablenkung eines ausgedehnten elektronenoptischen Bildes mittels gekreuzter elektrischer Ablenssysteme. Ann. Physik 8, 405—422 (1951).
214. *Hintenberger, H.*: Der Öffnungsfehler bei der ionenoptischen Abbildung eines Punktes mit Hilfe eines beliebig begrenzten homogenen Magnetfeldes. Z. f. Naturforsch. 6a, 275—276 (1951).
215. *Kanaya, K., und Kato, A.*: Über den Entwurf magnetischer Linsen für Elektronenmikroskope. The Memorial Treatises of Elektrotechnical Labor., August 1951.
216. *Kanaya, K.*: Koma in magnetischen Linsen für Elektronenmikroskope. Bull. Electrotechnical Labor. 15, 4 (1951).
217. *Kanaya, K.*: Bildfeldwölbung und Astigmatismus in magnetischen Linsen für Elektronenmikroskope. Bull. Elektrotechnical Labor. 15, 4 (1951).
218. *Kanaya, K.*: Verzeichnung in magnetischen Linsen für Elektronenmikroskope. Bull. Elektrotechnical Labor. 15, 2, 91 (1951).
219. *Kanaya, K.*: Öffnungs- und Farbfehler in magnetischen Linsen für Elektronenmikroskope. Bull. Electrotechnical Labor. 15, 2, 86 (1951).
220. *Lenz, F.*: Berechnung der elektronenoptischen Kenngrößen eines speziellen magnetischen Linsenfeldes ohne numerische Bahnintegrationen. Ann. Physik 9, 245—258 (1951).
221. *Liebmann, G., und Grad, E. M.*: Imaging properties of a series of magnetic electron lenses. Proc. phys. Soc. (London) B., 54, 956—971 (1951).
222. *Liebmann, G.*: The symmetrical magnetic electron microscope objective lens with lowest spherical aberration. Proc. phys. Soc. (London), B. 54, 972—977, (1951).
223. *Nadeau, G.*: Zonal correction of spherical aberration in magnetic lenses. Atti Accad. Naz. Lincei (R. C. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.) 10, 225—229 (1951).
224. *Rabin, B. M., Strashkewitsch, A. M., und Chin, L. S.*: Die elektronenoptischen Eigenschaften elektrostatischer

- Systeme mit von der Idealform abweichender Öffnung. J. techn. Phys. UdSSR. 21, 438—444 (1951).
1225. *Regenstreif, E.*: Théorie de la lentille électrostatique à trois électrodes. Ann. Radioélectrifié 6, 31—83 und 114—155 (1951).
1226. *Regenstreif, F.*: Une théorie de la lentille électrostatique indépendante à symétrie de révolution perturbée. Ann. Radioélectricité 6, 244—267 (1951).
1227. *Regenstreif, E.*: Théorie de régime transgaussien de la lentille électrostatique elliptique. Ann. Radioélectricité 6, 299—317 (1951).
1228. *Regenstreif, E.*: Sur la théorie de la lentille électrostatique indépendante à électrode centrale épaisse. C. R. Acad. Sci. Paris 232, 604—606 (1951).
1229. *Regenstreif, E.*: Die optischen Eigenschaften der elektrostatischen Einzellinse mit dicker Mittelelektrode. C. R. Acad. Sci. Paris 232, 710—712 (1951).
1230. *Regenstreif, E.*: Sur la théorie de la lentille électrostatique indépendante à électrode centrale elliptique. C. R. Acad. Sci. Paris 232, 1918—1920 (1951).
1231. *Seeliger, R.*: Die sphärische Korrektur von Elektronenlinsen mittels nichtrotationssymmetrischer Abbildungselemente. Optik 8, 311—317 (1951).
1232. *Spear, W. E.*: Investigation of electron optical properties of an electrostatic focusing system. Proc. phys. Soc. (London), B 64, 233—243 (1951).
1233. *Ssleman, O. I.*: Ableitung einer Formel für das Eikonal 4. Ordnung und die Bildfehlerkoeffizienten in der Elektronenoptik. Doklady Akad. Wiss. UdSSR. N. S. 81, 775—778 (1951).
1234. *Ssuschkin, N. G.*, und *Stojanow, P. A.*: Eine langbrennweitige Linse für das magnetische Elektronenmikroskop. Izvestija Akad. Wiss. UdSSR., phys. Serie 15, 341—346 (1951).
1235. *Sturrock, P.*: Formules nouvelles pour les aberrations du troisième ordre des lentilles magnétiques. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 146—147 (1951).
1236. *Sturrock, P.*: Formules nouvelles pour les aberrations du troisième ordre des lentilles électrostatiques. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 243—245 (1951).
1237. *Sturrock, P.*: Propriétés optiques des champs magnétiques de révolution de la forme $H = H_0 / [1 - (z/a)^2]$ et $H = H_0 / [(z/a)^2 - 1]$ sur l'axe optique. C. R. Acad. Sci. Paris 233, 401—403 (1951).
1238. *Walcher, W.*: Graphische Methode zur näherungsweise Bestimmung von Trägerbahnen in elektrostatischen Linsen unter Berücksichtigung des Raumladungseinflusses. Z. f. angew. Physik 3, 189—190 (1951).
1239. *Wendt, G.*: Zur Dioptrik elektrostatischer Elektronenlinsen. Z. f. angew. Physik 3, 219—225 (1951).
1240. *Zuckermann, I. I.*: Ein zur plankonkaven Linse analoges magnetisches elektronenoptisches System. J. techn. Phys. UdSSR. 21, 559—601 (1951).
1241. *Grivet, P.*: Sur le potentiel axial de la lentille à trois électrodes. J. Phys. et le Radium 13, 47—48 (1952).
1242. *Grivet, P.*: Éléments cardinaux d'un nouveau modèle de lentille électronique. C. R. Acad. Sci. Paris 234, 73—75 (1952).

A 2. Theorie der Wechselwirkung zwischen Strahl und Objekt

1243. *Zworykin, V. E.*: Image formation by electrons. Science in Progress 3, 69 (1942).
1244. *Green, T. A.*, und *Weigle, J.*: Théorie du moiré. Helv. Phys. Acta 21, 217 (1948).
1245. *Hillier, J.*, und *Ramberg, E. G.*: Some theoretical and practical considerations of image contrast in the electron microscope. Proc. Conference on Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 42—48 (1950).
1246. *Kanaya, K.*: Untersuchung der Temperatur der Objekte und ihre Strukturveränderungen infolge des Elektronenbeschusses im Elektronenmikroskop. Researches of the Electrotechnical Laboratory No. 509, Febr. 1949.
1247. *Kanaya, K.*: Elastic and inelastic scattering in electron microscopes. Bull. Electrotechnical Labor. 14, 5, 278 (1950).
1248. *Kanaya, K.*, und *Kato, A.*: Contrast of image in electron microscopes. I. Theoretical research. Bull. Electrotechnical Labor. 14, 5, 278 (1950).
1249. *Wjatskin, A. Ja.*: Unelastische Elektronenstreuung beim Durchgang durch Metalle. J. exper. theor. Physik UdSSR. 6, 557—565 (1950).
1250. *Borries, B. von.*: Die Gradation des übermikroskopischen Bildes. Z. f. wiss. Mikroskopie und für mikroskopische Technik 60, 69—82 (1951).
1251. *Motz, H.*: Applications of the radiation from fast electron beams. J. appl. Phys. 22, 527—535 (1951).

A. 3. Theorie der Grenzen der elektronischen Abbildung

252. *Gabor, D.*: Dynamics of electron beams. Applications of Hamiltonian dynamics to electronic problems. Proc. Inst. Radio. Engrs. N.Y. 33, 792 (1945).
253. *Broglie, L. de*: Die Untersuchung sehr kleiner Strukturen im Elektronenmikroskop. C. R. Acad. Sci. Paris 223, 490, (1946).
254. *Broglie, L. de*: Ein die Möglichkeiten der Korpuskular-Mikroskopie begrenzender Effekt. C. R. Acad. Sci. Paris 222, 1017 (1946).
255. *Rathburn, M. E., Eastwood, M. J., und Arnold, O. M.*: Report of the Electron Microscopy Society of America's Committee on Resolution. J. appl. Phys. 17, 989—996 (1946).
256. *Gabor, D.*: A new microscopic principle. Nature (London) 161, 777—778 (1948).
257. *Spiwak, G. W., und Lukatzkaja, R. A.*: Der zweite Grenzfall der Elektronenoptik. Doklady Akad. Wiss. UdSSR. 60, 375 (1948).
258. *Gabor, D.*: Microscopy by reconstructed wave fronts. I. Proc. Roy. Soc. A 197, 454—487 (1949).
259. *Bragg, W. L.*: Microscopy by reconstructed wave-fronts. Nature 166, 399—400 (1950).
260. *Gabor, D.*: Problems and prospects of electron diffraction microscopy. Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949, S. 55—59 (1950).
1261. *Haine, M. E., und Dyson, J.*: A modification to Gabor's proposed diffraction microscope. Nature 166, 315—316 (1950).
1262. *Hamme, F. A., und Snowden, P. C.*: Vibration studies: Related to electron microscope. Rev. Sci. Instr. 21, 426 bis 431 (1950).
1263. *Wegmann, L.*: Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens durch Fresnel'sche Beugung im Elektronenmikroskop. Helv. Phys. Acta 23, 437—452 (1950).
1264. *Wegmann, L.*: Zur Frage der Abbildung von Atomabständen im Elektronenmikroskop. Helv. Phys. Acta 23, 867—868 (1950) und 24, 63—71 (1951).
1265. *Bragg, W. L., und Rogers, G. L.*: Elimination of the unwanted image in diffraction. Nature 167, 100—101 (1951).
1266. *Gabor, D.*: Electron optical systems with helical axis. Proc. physic. Soc. (London), B 64, 244—255 (1951).
1267. *Gabor, D.*: Microscopy by reconstructed wave fronts II. Proc. physic. Soc. (London), B 64, 449—469 (1951).
1268. *Gabor, D.*: Diffraction Microscopy. Research 4, 107—112 (1951).
1269. *Mahl, H.*: Atomanordnungen in Kristallen werden sichtbar gemacht. Die Zwei-Wellen-Mikroskopie. Umschau 51, 238—239 (1951).

B. Optik der Übermikroskope

B. 1. Allgemeiner Aufbau und Strahlengang der Übermikroskope

270. *Charles, D.*: Die Messung schwacher Magnetfelder und die Wirkung von Abschirmungen. Anwendung auf das Elektronenmikroskop. Ann. de Radio-électr. 2, 75 (1947).
271. *Haine, M. E., und Lee, A. M.*: The electron optical system of the electron microscope. J. Sci. Instr. 24, 61—66 (1947).
272. *Meryman, H. T.*: An electromagnetic focusing device for the electron microscope. Rev. Sci. Instr. 20, 955 (1949).
273. *Silverman, L. B., Elliott, S. B., und Greenfield, M. A.*: Radiation survey of x-ray output of an electron microscope from personal hazard viewpoint. Science 110, 376—377 (1949).
1274. *van Hengel, J., und Kramer, J.*: High-tension microscope alignment. Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949, S. 38—39 (1950).
1275. *Okada, S.*: Das Problem der vom Elektronenmikroskop ausgehenden Röntgenstrahlung. J. Electr. Micr. Japan 1, 129 (1950).
1276. *Watson, J. H. L., und Preuss, L. E.*: X-radiation from electron microscopes, Science 112, 407—409 (1950).
1277. *Glaser, W., und Robl, H.*: Apertur und Blenden magnetischer Übermikroskope. Österr. Ing. Archiv 5, Heft 1 (1951).
1278. *Knoerzer, G.*: Zur Beseitigung störender Aufladungen nichtleitender Objekte und Leuchtschirme im Elektronenstrahl. Z. f. Naturforsch. 6a, 511—512 (1951).

B 2. Erzeugung und Beeinflussung des beleuchtenden Strahles

1279. *Smith, L. P., und Hartmann, P. L.*: Formation and maintenance of electron and ion beams. *J. appl. Phys.* 11, 220 (1940).
1280. *Calbick, C. J.*: Energy distribution of electrons with dense electron beams. *Physic. Rev.* 65, 353 (1944).
1281. *Pierce, J. R.*: Limiting stable current in electron beams in the presence of ions. *J. appl. Phys.* 15, 721 (1944).
1282. *Samuel, A. L.*: Some notes on the design of electron guns. *Proc. I.R.E.* 33, 233 (1945).
1283. *Blewett, J. P.*: Oxide-coated cathodes. *J. appl. Phys.* 17, 643 (1946).
1284. *Brillouin, L.*: Influence of space-charge on the bunching of electron beams. *Physic. Rev.* 70, 187 (1946).
1285. *Kleynen, P. H. J. A.*: Extension of Langmuir's (ξ , η) tables for a plane diode with a Maxwellian distribution of the electrons. *Philips Res. Rep.* 1, 81 bis 96 (1946).
1286. *Van der Ziel, A.*: Extension and application of Langmuir's calculations on a plane diode with Maxwellian velocity distribution of the electrons. *Philips Res. Rep.* 1, 97—118 (1946).
1287. *Bricka, M., und Bruck, H.*: A new electron gun for high-voltage tubes. *Ann. Radioélec.* 3, 339 (1948).
1288. *Einstein, P. A., und Jacob, L.*: On some focal properties of an electron optical immersion objective. *Phil. Mag.* 39, 20 (1948).
1289. *Jacob, L.*: The variation of beam angle with modulation in electron optical immersion systems. *Phil. Mag.* 39, 400 (1948).
1290. *Wax, N.*: Some properties of tubular electron beams. *J. appl. Phys.* 20, 242—247 (1949).
1291. *De, M. L.*: An experimental study of the illuminating system of electron microscope. *Indian. J. Phys.* 24, 303 bis 308 (1950).
1292. *Eto, H., und Okada, S.*: Study of the illuminating system of the electron microscope. *J. Electron Microscopy Japan* 1, 107—110 (1950).
1293. *Jacob, L.*: Some crossover properties in the electron immersion objective. *J. appl. Phys.* 21, 966—970 (1950).
1294. *Linder, E. G., und Hernquist, K. G.*: Space-charge effects in electron beams and their reduction by positive ion trapping. *J. appl. Phys.* 21, 1088 bis 1097 (1950).
1295. *Moss, H., Woodbridge, L., und Webb, M.*: Dimensional tolerance in cathode-ray-tube guns. Effects of misalignment and electrode deformation on performance. *Proc. Inst. Electrical Eng. Part III*, 97, 277—283 (1950).
1296. *Renaud, P.*: Experimental study of an electron gun for electron diffraction. *Journ. Phys. Radium* 11, 619 (1950).
1297. *Steigerwald, K. H.*: Eine positive Emission an der Glühkathode. *Z. f. angew. Physik* 2, 491—493 (1950).
1298. *Widell, E. G., und Heller, R. A.*: Effect of coating composition of oxidecoated cathodes on electron emission. *J. appl. Phys.* 21, 1115—1118 (1950).
1299. *Boadway, J. D.*: A condenser aperture device for electron microscopes. *J. Appl. Phys.* 22, 104—105 (1951).
1300. *Ploke, M.*: Elementare Theorie der Elektronenstrahlerzeugung mit Triodensystemen. I. Eigenschaften des statischen Feldes der gebräuchlichen Strahlsysteme. *Z. f. angew. Physik* 3, 441—449 (1951).

B 3. Streuung und Beugung des Strahles im Objekt; Erwärmung und Ionisierung des Objektes; Objektänderung

1301. *Petuchow, W. A., und Wyschinsky, I. A.*: Kernstreuung von Elektronen in dünnen metallischen Filmen. *J. Phys. UdSSR.* 4, 235—245 (1941); *J. exp. theor. Phys. UdSSR.* 10, 1178—1188 (1941).
1302. *Broglie, L. de*: La diffusion cohérente et le microscope corpusculaire. *C. R. Acad. Sci. Paris* 224, 1743—1745 (1947).
1303. *Palluel, P.*: Sur le mécanisme de la rediffusion électronique par les métaux. *C. R. Acad. Sci. Paris* 224, 1551 (1947).
1304. *Pokrowskij, G. I., und Lichtman, W. I.*: Die Strukturänderungen eines Metalls bei Einwirkung einer kondensierten elektrischen Entladung. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR.* 59, 687—699 (1948).
1305. *Bibermann, L. M., Wiorow, Je N., Kowner, J. A., Ssuschkin, N. G., und Jaworski, B. M.*: Über die Streuung von Elektronen in dünnen Schichten. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR. N. S.* 69, 519 (1949).
1306. *Forestier, N., Hassler, C., und Uhl, M.*: Die Temperaturerhöhung metallischer Objekte im Elektronenmikroskop. *C. R. Acad. Sci. Paris* 230, 2080—2082 (1950).

07. *Hillier, J., Mudd, S., Smith, A. G., und Beutner, E. H.*: The „fixation“ of electron microscopic specimens by the electron beam. *J. Bact.* 60, 641—654 (1950).
 08. *Hillier, J.; und Ramberg, E. G.*: Some theoretical and practical considerations of image contrast in the electron microscope. *Proc. of the Conference on Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 42—48* (1950).
 09. *König, H.*: Zur Veränderung von Kristallen im Elektronenmikroskop. *Optik* 7, 261—262 (1950).
 10. *Lopes, H. B.*: Die Wirkung der Temperatur auf im Elektronenmikroskop untersuchte Präparate. *An. Akad. Brasil. Ci.* 22, 115—121 (1950).
 11. *Paul, W., und Schubert, G.*: Physikalische Vorgänge und biologische Wirkungen in mit schnellen Elektronen bestrahlten Objekten. *Naturwiss.* 37, 156 (1950).
 12. *Warshaw, S. D., und Chen, J. J. L.*: The probable energy loss of electrons in matter. *Physic. Rev.* 80, 97—98 (1950).
 13. *Hall, C. E.*: Scattering, phenomena in electron microscope image formation. *J. Appl. Phys.* 22, 655—662 (1951).
 14. *Kanaya, K., und Kato, A.*: Contrast of images in electron microscopes. II. Experimental research. *Bull. Electro-technical Labor.* 15, 4 (1951).
 15. *Knoerzer, G.*: Zur Beseitigung störender Aufladungen nichtleitender Objekte und Leuchtschirme im Elektronenstrahl. *Z. Naturforsch.* 6a, 511 bis 512 (1951).
 16. *König, H.*: Verkohlungen organischer Objekte durch Elektronen (im Elektronenmikroskop). *Z. f. Physik* 129, 483—490 (1951).
 17. *Schultz, W.*: Energieverlust schneller Elektronen beim Durchgang durch Folien (Vielfachstreuung). *Z. f. Physik* 129, 530—536 (1951).
- 4. Elektronenlinsen starker Brechkraft**
18. *Pierce, J. R.*: Electron beams in strong magnetic fields. *Phys. Rev.* 68, 629 (1945).
 19. *Coggeshall, N. D.*: Fringing flux corrections for magnetic focussing devices. *J. appl. Phys.* 18, 855 (1947).
 1320. *Hillier, J., und Froula, H.*: On the testing of electron microscope objectives. Paper No. 4, RCA Laboratories, Princeton, New Jersey, presented at the EMSA meeting, Washington D.C. 1949.
 1321. *Hubert, P.*: Lentille magnétique à axe curviligne. *C. R. Acad. Sci. Paris* 228, 302 (1949).
 1322. *Cooper, J. R.*: Effect of coil current reversal on distortion in an EMU-2A electron microscope with extended range lens. Vortrag, gehalten auf der Tagung der EMSA in Detroit im September 1950. Referat in *Mikroskopie* 5, 300 (1950).
 1323. *Ito, K., und Ito, T.*: Untersuchungen über den Entwurf magnetischer Elektronenlinsen für Elektronenmikroskope. II. *J. Electr. Micr. Japan* 1, 111—112 (1950).
 1324. *Lenz, F.*: Berechnung optischer Kenngrößen magnetischer Elektronenlinsen aus Polschuhabmessungen und Betriebsdaten. *Z. f. angew. Physik* 2, 448—453 (1950).
 1325. *Hillier, J.*: An objective for use in the electron microscopy of ultrathin sections. *J. Appl. Phys.* 22, 135—137 (1951).
 1326. *Klemperer, O.*: On a new test method for spherical aberration of electron lenses. *Proc. physic. Soc. (London) B*, 64, 790—794 (1951).
 1327. *Plachow, A. G.*: Experimentelle Untersuchung des Feldes starker magnetischer Linsen des Elektronenmikroskops. *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR. Phys. Serie* 15, 347—354 (1951).
 1328. *Reisner, J. H.*: Permanent magnet lenses. *J. appl. Phys.* 22, 561—565 (1951).

B 5. Leuchtschirme und photographische Schichten

1329. *Zelinskij, W. W.*: Ein Leuchtschirm von hohem Auflösungsvermögen. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR.* 40, 220 (1943).
1330. *Chilton, L. V., Crook, E. M., und Sheffield, F. M. L.*: Photographic materials for the electron microscope. *Electr. Eng.* 17, 363 (1945).
1331. *Tajima, M.*: Die photographische Wirkung von Elektronenstrahlen. *Jour. Electr. Micr. Japan* 1, 86—91 (1950).

B 6. Rückstrahlabbildung

1332. *Kuschnir, Ju. M., Biberman, L. M., und Lewkin, N. P.*: Ein Reflexions-elektronenmikroskop (EM-100). *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR., phys. Serie* 15, 306—316 (1951).

B 7. Emissionsabbildung

1333. *Arimowitsch, L. A.*: Die elektronen-optischen Eigenschaften von Emissionssystemen. *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR., phys. Ser.* 8, 313 (1944).
1334. *Rathenau, G. W., und Baas, G.*: Grain growth in a texture, studied by means of electron-emission-microscopy. *Physica* 17, 117—128 (1951).
1335. *Rathenau, G. W.*: Étude des phénomènes de recristallisation par microscopie électronique à émission. *Riv. Metallurgia* 48, 923—928 (1951).
1336. *Spiwak, G. W., und Rosenfeld, A. M.*: Ein Emissionselektronenmikroskop von hoher Auflösung. *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR., phys. Serie* 15, 317 (1951).

B 8. Filterung

1337. *Boersch, H.*: Ein Elektronenfilter für Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung. *Optik* 5, 436—450 (1949).
1338. *Möllenstedt, G., und Rang, O.*: Die elektrostatische Linse als hochauflösendes Geschwindigkeitsfilter. *Z. f. angew. Physik* 3, 187—189 (1951).

B 9. Raster-Verfahren

1339. *Castaing, R., und Guinier, A.*: Application des sondes électroniques à l'analyse métallographique. *Proc. Conference on Electron Microscopy Delft*, Juli 1949, S. 60—63 (1950).

B 10. Besondere Abbildungsverfahren, z. B. Stereoskopie, Objektheizung usw.

1340. *Hall, C. E.*: Dark-field electron microscopy. *J. appl. Phys.* 19, 121 (1948).
1341. *Marton, L., und Lachenbruch, S. H.*: Electron-optical shadow method for plotting and measuring microscopical fields. *Instruments* 22, 808 (1949).
1342. *Agar, A. W., und Revell, R. S. M.*: A preliminary report on attempts to realise a phase contrast microscope. *Proc. Conference on Electron microscopy, Delft*, Juli 1949, S. 52—54 (1950).
1343. *Heise, F.*: Raumbilder im Elektronenmikroskop. *Optik* 7, 256—260 (1950).
1344. *Preuss, L. E., und Watson, J. H. L.*: A technique for taking motion pictures of electron microscope images. *J. appl. Phys.* 21, 902—903 (1950).
1345. *Watson, J. H. L., und Preuss, L. E.*: Motion pictures studies of electron bombardment of colloidal crystals. *J. appl. Phys.* 21, 904—907 (1950).
1346. *Winkler, A.*: Zur Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Bakteriologie. *Z. Naturforsch.* 6b, 72—76 (1950).
1347. *Baker, R.*: Phase-contrast methods and birefringence. *Nature* 167, 642 bis 643 (1951).
1348. *Bertein, F.*: Sur la détermination expérimentale des champs par la méthode électronique de Marton. *C. R. Acad. Sci. Paris* 232, 491—493 (1951).
1349. *Helmcke, J.-G., und Richter, H.*: Photogrammetrische Ausmessung elektronenmikroskopischer Stereobilder. *Z. wiss. Mikrosk. u. mikr. Techn.* 60, 189—196 (1951).
1350. *Helmcke, J.-G., und Richter, H.*: Die Elektronenmikroskopie in der Photogrammetrie. *Allgem. Vermessungsnachrichten* Nr. 6, 142—148 (1951).
1351. *Sharpe, J. W.*: A stereoscopic technique for use with an electron microscope. *Brit. appl. Phys.* 2, 78—80 (1951).

C. Elektronenbeugungsverfahren

1352. *Hause, C. D., Woodward, J. G., und McClellan, C. E.*: Direct measurement of the intensity distribution in Fresnel diffraction patterns. *J. opt. Soc. Amer.* 29, 147 (1939).
1353. *Thomson, G. P., und Cochrane, W.*: Theory and practice of electron diffraction. *MacMillan and Co. Ltd.* 1939, Kapitel 19, S. 150.
1354. *Boettcher, A.*: Herstellung temperaturbeständiger Trägerfolien für die Bestimmung von Gitterkonstanten metallischer Mehrstoffsysteme mittels Elektroneninterferenzen. *Kolloid-Z.* 100, 228—230 (1942).
1355. *Chaudron, G.*: Die Anwendung der Elektronenbeugung und thermomagnetischen Analyse auf die Untersu-

- chung von Oxydfilmen auf der Oberfläche von Eisenmetallen. *Métaux corr. usure* 17, 155 (1942).
356. *Prebus, A. F.*: Combined electron diffraction and microscope apparatus. *Physic. Rev.* 63, 462 (1943).
357. *Thomson, G. P.*: Electron diffraction. *J. Inst. Metals* 69, 191 (1943).
358. *Skinner, H. A., und Sutton, L. E.*: Investigation by electron diffraction of the structures of halogen derivatives of tin, arsenic and nitrogen. *Trans. Faraday Soc.* 40, 164 (1944).
359. *Bachman, C. H.*: Electron diffraction instrument. *Gen. Electr. Rev.* 48, 7 (1945).
360. *Bachman, C. H.*: General electric diffraction apparatus. *J. appl. Phys.* 16, 265 (1945).
361. *Rymer, T. B., und Butler, C. C.*: Precision of measurement of broad spectrum lines with special reference to electron diffraction photographs. *Phil. Mag.* 36, 515 (1945).
362. *Simard, G. L., Burton, C. J., und Barnes, R. B.*: High dispersion electron diffraction by primary magnification. *J. appl. Phys.* 16, 832 (1945).
363. *Wells, A. F.*: Diffraction methods in modern structural chemistry. *Nature* 155, 353 (1945).
364. *Cowley, J. M., und Rees, A. L. G.*: Refraction effects in electron diffraction. *Nature* 158, 550 (1946).
365. *Gulbransen, A., und Hickmann, J. W.*: An electron diffraction study of oxide films formed on iron, cobalt, nickel, chromium and copper at high temperatures. *Metals Technol.* 13, No. 7 (1946).
366. *Trillat, J. J.*: Diffraction d'électrons non monocinétiques et application à la mesure des hautes tensions alternatives. *C. R. Acad. Sci. Paris* 223, 322—324 (1946).
367. *Weigle, J. J.*: Electron diffraction pattern and electronic image formation of mica. Meeting EMSA Dezember 1946.
368. *Brockway, L. C., und Karle, J.*: Electron diffraction study of oleophobic films on copper, iron and aluminium. *J. Coll. Sci.* 2, 277—287 (1947).
369. *Cowley, J. M., und Rees, A. L. G.*: Refraction effects in electron diffraction. *Proc. physic. Soc. (London)* 59, 287 (1947).
370. *Friesen, S. von, und Lenander, S.*: Measurements of the relative intensity in electronic Debye-Scherrer diagrams. *Ark. Mat. Astr. Fys.* 33 A, No. 4, Paper 20, 1947.
1371. *Hickman, J. W., und Gulbransen, E. A.*: Electron diffraction study of oxide films formed on molybdenum tungsten and alloys of molybdenum tungsten and nickel. *Metals Technol.* 14, No. 3 (1947).
1372. *Karle, J., und Brockway, L. C.*: The interpretation of electron diffraction patterns from hydrocarbon films. *J. Chém. Phys.* 15, 213 (1947).
1373. *Karle, J., und Karle, I. J.*: An objective method for studying electron diffraction by gases. *J. Chem. Phys.* 15, 764 (1947).
1374. *Rymer, T. B., und Butler, C. C.*: Determination of the crystal structure of gold leaf by electron diffraction. *Proc. physic. Soc. (London)* 59, 541 (1947).
1375. *Schomaker, V., und O'Gorman, J. M.*: An electron diffraction investigation of formic acid monomers. *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 2638 (1947).
1376. *Trillat, J. J.*: Elektronenbeugung und ihre Anwendungen. *Experientia* 3, 85 (1947).
1377. *Courtet, R.*: Die Präparation reiner Metalloberflächen durch mechanisches Schleifen im Vakuum und die Untersuchung solcher Flächen durch Elektronenbeugung. *C. R. Acad. Sci. Paris* 226, 793 (1948).
1378. *Friesen, S. von.*: On a new way of studying the energy relations in electron diffraction patterns. *Ark. Mat. Ast. Fys.* 35 A, No. 18 (1948).
1379. *Hoerni, J., und Weigle, J.*: Diffraction des électrons par le graphite. *Helvetica Physica Acta* 21, 215—216 (1948).
1380. *Keogh, C. T., und Weber, A. H.*: Electron diffraction study of particle size in thin Bi-films deposited by evaporation in vacuum. *J. appl. Phys.* 19, 1077 (1948).
1381. *Raether, H.*: Zum Nachweis von Oberflächenfilmen mittels Elektroneninterferenzen. *Z. f. Naturforsch.* 4a, 582 bis 587 (1949).
1382. *Tazaki, H., und Hashimoto, H.*: Studies on the surfaces of copper alloys by electron diffraction. *J. Sci. Hiroshima Univ.* 14, 44—47 (1949).
1383. *Trillat, J. J., und Laloëuf, A.*: Étude par diffraction électronique des vapeurs d'iode d'argent. *C. R. Acad. Sci. Paris* 228, 81—83 (1949).
1384. *Allen, D. W., und Sutton, L. E.*: Tables of interatomic distances and molecular configurations obtained by electron

- diffraction in the gas phase. *Acta Crystallographica* 3, 46—72 (1950).
1385. *Andrews, C. I.*: Diffraction pattern in a circular aperture measured in the microwave region. *J. appl. Phys.* 21, 761—767 (1950).
1386. *Baddykjan, G. O.*: Ein Universal-Elektronograph. Betriebslabor, UdSSR. 16, 1445—1449 (1950).
1387. *Bilde, H.*: Methoden der Deutung von Elektronen-Beugungsbildern. *Ann. de Radioélectricité* 5, 354—390 (1950).
1388. *Boswell, F. W. C.*: A standard substance for precise electron diffraction measurements. *Physic. Review* 80, 91—92 (1950).
1389. *Harvey, R. B.*, und *Keidel, F. A.*, und *Bauer, S. H.*: Some effect of nozzle design on the diffraction of electrons by gases: *J. appl. Phys.* 21, 860—874 (1950).
1390. *Heston, B. C.*, und *Cutter, P. R.*: Molecular diffraction attachment for RCA microscope. *Rev. sci. Instruments* 21, 608—612 (1950).
1391. *Hoerni, J.*: Diffraction of electrons by graphite. *Helv. physica Acta* 23, 587 bis 622 (1950).
1392. *Ito, T.*, und *Sawada, H.*: An electron-diffraction study of Chalcopyrite film grown upon Enargite. *Acta Crystallographica* 3, 434 (1950).
1393. *Jaffe, M. S.*: Improving precisising of powder diffraction with the RCA-EMU electron microscope. Vortrag, gehalten auf der Tagung der EMSA in Detroit, Sept. 1950. Referat in *Mikroskopie* 5, 300 (1950).
1394. *Kohra, K.*, und *Miyake, Sh.*: An exception to Friedel's law in electron diffraction. II. Theoretical consideration. *Acta Crystallographica* 3, 479 (1950).
1395. *Menter, J. W.*, und *Sanders, J. V.*: Apparatus for the study by electron diffraction of the effect of temperature on surface films. *J. Sci. Instr.* 27, 335 (1950).
1396. *van Ments, M.*, und *Le Poole, J. B.*: A diffraction apparatus. *Proc. Conference on Electron Microscopy*, Delft, Juli 1949, S. 35—37 (1950).
1397. *Miyake, Sh.*, und *Uyeda, R.*: An exception to Friedel's law in electron diffraction. *Acta Crystallographica* 3, 311 (1950).
1398. *Pinsker, S. G.*, und *Weinstein, B. K.*: Dynamische Elektronenbeugung. *Isvestija Akad. Wiss. UdSSR.*, phys. Serie 14, 212—222 (1950).
1399. *Rees, A. L. G.*, und *Spink, J. A.*: The shape transform in electron diffraction by small crystals. *Acta Crystallographica* 3, 316 (1950).
1400. *Rühle, R.*: Übersichts- und Feinstrahlbeugungsbilder an einem Elektronenmikroskop mit Hilfsprojektiven. *Optik* 7, 267—278 (1950).
1401. *Schomaker, V.*, und *Pu, C. S.*: An electron diffraction investigation of nitrogen trifluoride. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1132—1185 (1950).
1402. *Schulz, L. G.*: Examination of thin overgrowths by multiple scattering of electrons. *J. appl. Phys.* 21, 942—943 (1950).
1403. *Tazaki, H.*, und *Kuwabara, S.*: A study of sulphide films on copper by electron diffraction. I. *Sci. Hiroshima Univ.* 14, 251—254 (1950).
1404. *Trillat, J. J.*, und *Oketani, S.*: Étude par diffraction électronique de la cémentation du fer. *C. R. Acad. Sci. Paris* 230, 2203—2205 (1950).
1405. *Trillat, J. J.*, und *Oketani, S.*: Appareil pour l'étude des surfaces isolantes par diffraction électronique. *J. Rech. Cent. Nat. Rech. Sci. No. 12*, 148—149 (1950); *Le Vide* 28, 827 (1950).
1406. *Trillat, J. J.*, und *Pierrée, C.*: Kontrolle der Reinheit flüssiger Kohlenwasserstoffe durch Elektronenbeugung. *J. Rech. Cent. Nat. Rech. Sci. No. 13*, 183—185 (1950).
1407. *Yamasaki, K.*, *Kotera, A.*, *Yokoi, M.*, und *Ueda, Y.*: An electron diffraction study of structures of tetramethylorthosilicate, hexamethyldisiloxane, and hexachlorodisiloxane. *J. Chem. Phys.* 18, 1414 (1950).
1408. *Allen, P. W.*, *Mackie, H.*, und *Sutton, L. E.*: An improved electron diffraction camera. *J. Sci. Instr.* 28, 144—151 (1951).
1409. *Brown, J. F.*, und *Clark, D.*: Identification and crystal habit of chromium carbide, Cr_{23}C_6 , as determined by electron diffraction. *Nature (London)* 167, 728 (1951).
1410. *Castaing, R.*, und *Guinier, A.*: Méthode d'analyse cristallographique ponctuelle. *C. R. Acad. Sci. Paris* 232, 1948—1950 (1951).
1411. *Fues, E.*, und *Wagner, E. H.*: Zur Streifenstruktur der Kossel-Möllenstedtschen Elektroneninterferenzen mit konvergentem Bündel II. *Z. Naturforsch.* 6a, 79—84 (1951).
1412. *Honjo, G.*, und *Mihama, K.*: Fine structure of electron-diffraction spots

- due to particle shape and to the method of shadow-casting. *Acta Crystallographica* 4, 282—283 (1951).
1413. *Kato, N., und Uyeda, R.*: Dynamical theory of electron diffraction for a finite polyhedral crystal I. *Acta Crystallographica* 4, 227—229 (1951).
1414. *Kato, N., und Uyeda, R.*: Dynamical theory of electron diffraction for a finite polyhedral crystal II. Comparison with the results of kinematical theory. *Acta Crystallographica* 4, 229—231 (1951).
1415. *Knapf, D. R., und Mitra, R. P.*: Electron diffraction by clay minerals with a fibrous of rod-like habit. *Nature* 168, 380 (1951).
1416. *König, H.*: Über Kohlenstoffplatin. *Die Naturwiss.* 38, 154—155 (1951).
1417. *Menzel-Kopp, Chr.*: Intensitäts- und Lagen-Anomalien bei Elektroneninterferenzen. *Ann. Physik* 9, 259—283 (1951).
1418. *Mukherjee, N. R., und Row, O.*: Studies of thin films by electron diffraction. *J. appl. Phys.* 22, 681—682 (1951).
1419. *Raether, H.*: Étude par diffraction électronique de la transformation ordre-désordre de l'alliage AuCu.. *Acta Crystallographica* 4, 70 (1951).
1420. *Stahl, A.*: Methodik und Anwendung der Elektronenbeugung in der Industrieforschung. *Z. f. angewandte Physik* 3, 349—360 (1951) und 3, 382 bis 396 (1951).
1421. *Stauder, W. V., und Weber, A. H.*: Electron diffraction studies of etched Au leaf films. *J. Franklin Inst.* 251, 351—57 (1951).
1422. *Tazaki, H., und Kuwabara, S.*: A study of oxide films formed on copper-magnesium alloys by electron diffraction. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A* 15, 67—70 (1951).
1423. *Trillat, J. J., und Oketani, S.*: Étude par diffraction électronique de la cémentation du fer. *Rev. de Métallurgie* 48, 289—294 (1951).
1424. *Trillat, J. J., und Oketani, S.*: Étude par diffraction électronique de la cémentation du fer. II. Action de mélange CO + H₂. *C. R. Acad. Sci. Paris* 232, 1116—1118 (1951).
1425. *Wagner, E. H.*: Zur Streifenstruktur der Kossel-Möllenstedtschen Elektroneninterferenzen mit konvergentem Bündel. III. *Z. f. Naturforsch.* 6a, 133 bis 139 (1951).

D. Elektronenspektrographie

1426. *Deutsch, M., Elliot, L. G., und Evans, R. D.*: Theory, design and applications of a short magnetic lens electron spectrometer. *Rev. sci. Instruments* 15, 178 (1944).
1427. *Marton, L.*: On electron microspectroscopy. *Physic. Rev.* 66, 159 (1944).
1428. *Slaetis, H.*: On a photographic method for investigating the optical properties of magnetic lenses and for recording β -ray lines. *Ark. Mat. Astr. Fys.* 32 A (No. 4) Paper 20, 27 (1946).
1429. *Siegbahn, K.*: A magnetic lens of special field form for β - and γ -ray investigations, designs and applications. *Philosophical Magazine* 36, 162 (1946).
1430. *Slaetis, H., und Siegbahn, K.*: A new type of focusing in a magnetic lens. *Physic. Rev.* 75, 1955 (1949).
1431. *Bothe, W.*: Prinzip eines Doppellinsenspektrometers für β - und γ -Strahlen. *Naturwiss.* 37, 41 (1950).
1432. *Bothe, W.*: Theorie des Doppellinsenspektrometers. Sitzungsbericht der Heidelberger Akademie der Wissenschaft Jg. 1950, 191—201.
1433. *Glaser, W.*: Richtungs-Doppelfokussierung von Elektronenbahnen in inhomogenen elektrisch-magnetischen Feldern. *Österr. Ing.-Archiv* 4, 354 bis 362 (1950).
1434. *Grivet, P.*: Les spectrographes β à lentilles électroniques. (Théorie unifiée des types classiques: un nouvel appareil) I. *Le Journal de Physique et le Radium* 11, 582—595 (1950).
1435. *Schoen, A. L., und Hodge, E. S.*: Photographing spectra in the vacuum ultraviolet. *J. opt. Soc. America* 40, 23 (1950).
1436. *Verster, N. F.*: Spherical aberration of a double focusing beta ray spectrometer. *Physica* 16, 815—816 (1950).
1437. *Verster, N. F.*: Theory of a magnetic lens type beta ray spectrometer. *Appl. Sci. Res. B* 1, 363—378 (1950).
1438. *Grivet, P.*: Les spectrographes β à lentilles électroniques. (Théorie unifiée des types classiques: un nouvel appareil) II. *Le Journal de Physique et le Radium* 12, 1—14 (1951).

1439. *Lenz, F.*: Hochauflösende Geschwindigkeitsanalyse mit magnetischen Elektronenlinsen. *Naturwiss.* 38, 524 bis 525 (1951).
1440. *Verster, N. F., Hijgh, G. J. van Lies-*

hout, R., und Bakker, C. J.: Measurement of the radiation from ^{131}I and ^{131}Xe with a lens type beta-ray spectrometer. *Physica* 17, 637—657 (1951).

E. Sonstige Mikroskope

E 1. Feldelektronenmikroskope

1441. *Müller, E. W.*: Sichtbarmachung der Phthalocyaninmolekel mit dem Feldelektronenmikroskop. *Naturwiss.* 37, 333—334 (1950).
1442. *Müller, E. W.*: Die Sichtbarmachung einzelner Atome und Moleküle im Feldelektronenmikroskop. *Z. Naturforsch.* 5a, 473—479 (1950).

E 2. Ionen- und Protonenmikroskope

1443. *Magnan, C., Chanson, P., und Ertaud, A.*: On the design of a proton microscope. *C. R. Acad. Sci. Paris* 220, 770 (1945).
1444. *Chanson, P.*: Optics of electrostatic lenses and the proton microscope. *Ann. Phys. Paris (Ser. 12)* 2, 333 (1947).
1445. *Sasaki, N.*: An ion microscope with a transverse magnetic field. *J. appl. Phys.* 19, 1050 (1948).
1446. *Bertein, F.*: Convergence transversale créée par les fentes des instruments d'optique ionique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 251, 766—767 (1950).
1447. *Chanson, P., und Magnan, C.*: Sur les premières images obtenues avec un microscope protonique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 233, 1436—1438 (1951).
1448. *Honeycombe, R. W. K.*: A simple method of x-ray microscope and its applications to the study of deformed metals. *J. Inst. Metals* 1, 39—44 (1951).

1449. *Sommeria, J.*: Un nouveau principe de source d'ions à grande intensité. *J. de Physique* 12, 563—564 (1951).

E 3. Röntgenmikroskope

1450. *Wilsdorf, H.*: Röntgenoptik mit doppelt gekrümmten natürlichen Kristallen. *Naturwiss.* 35, 313 (1948).
1451. *Magnéli, A.*: Perforated plates for optical interference experiments. Optical fourier summation by means of the "X-ray microscope". *J. sci. Instruments* 28, 122 (1951).
1452. *Wilsdorf, H.*: Röntgenoptik mit Kristallreflektoren. *Naturwiss.* 38, 250 bis 258 (1951).
1453. *Cosslett, V. E., und Nixon, W. C.*: X-ray shadow microscope. *Nature* 168, 24—25 (1951).
1454. *Lucht, Ch. M., und Harver, D.*: An x-ray microscope using mirrors of adjustable curvature. *Rev. sci. Instruments* 22, 392—395 (1951).

E 4. Abbildung mit neutralen Atomen

1455. *Friedburg, H.*: Optische Abbildung mit neutralen Atomen. *Z. f. Physik* 130, 493—512 (1951).
1456. *Friedburg, H., und Paul, W.*: Optische Abbildung mit neutralen Atomen. *Naturwiss.* 38, 159—160 (1951).

F. Technik der Übermikroskope

F 1. Allgemeines und Übersichten

1457. *Dorgelo, H. B.*: Introduction to electron microscopes of different types. *Nederlandsch. Tijdschr. v. Natuurk.* 7, 157 (1940).
1458. *Hillier, J., und Vance, A. W.*: Recent developments in the electron microscope. *Proc. Inst. Radio Engr.* 29, 167 (1941).
1459. *Barnes, R. B., und Burton, C. J.*: Additions to the electron microscope and its uses. *A. S. T. M. Bull.* 116, Oktober 1942.

1460. *Bruck, H., und Grivet, P.*: Das Elektronenmikroskop. Anwendung des Instrumentes und angewandte Technik. *J. des États de Surface.* 162, Oktober 1945.
1461. *Dupouy, G.*: Magnetische Elektronenoptik und ihre Anwendung auf das magnetische Elektronenmikroskop. *L'Optique Électronique*, Éd. L. de Broglie, Éditions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale Paris, S. 161, 1946.
1462. *Magnan, C.*: Elektronenoptik und ihre Anwendung auf das elektrostatische

- Elektronenmikroskop. L'Optique Électronique, Éd. L. de Broglie, Éditions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale, Paris, S. 18 (1946).
1463. *Daby, J. R.*: The electron microscope. A general review of the instrument and its uses. Iron and Coal Trans. Rev. 154, 623 (1947).
1464. *Dupouy, G.*: Construction and operation of the electron microscope. J. Sci. Instr. 24, 113 (1947).
1465. *Garrod, R., Cuckow, F. W., und Timms, J.*: Construction and operation of the electron microscope. J. Sci. Instr. 24, 113 (1947).
1466. *Reed, R.*: Construction and operation of the electron microscope. J. Sci. Instr. 24, 117 (1947).
1467. *Schmidt, R.*: Microscope électronique à lentilles magnétiques. Métaux & Corrosion 24, 235—238 (1949).
- F 2. Beschreibungen von Serien-Geräten**
1468. *Zworykin, V. K.*: Portable electron microscope. Sci. American 168, 74 (1943).
1469. *Zworykin, V. K., Hillier, J., und Smith, P. C.*: New electron microscope. Sci. American 169, 76 (1944).
1470. *Anderson, T. F.*: The optics of the RCA electron microscope. Biol. Abs. 19, 949 (8787), 1945.
1471. *van Dorsten, A. C., Le Poole, J. B., und Verhoff, A.*: A new electron microscope. The Philips E. M. 100. Instruments and Measurements Conf. Stockholm 1947, Transactions, S. 216—218.
1472. *van Dorsten, A. C.*: The Philips electron microscope, Type 11980. Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949, S. 40—41 (1950).
1473. *van Dorsten, A. C., Niewdorp, H., und Verhoff, A.*: Das Philips-Elektronenmikroskop für 100 kV. Philips' Techn. Rundschau 12, 33—52 (1950).
1474. *Eckardt, F.*: Die Technik des OSW-Elektronenmikroskops. Elektrotechnik 4, 414—415 (1950).
1475. *Kinder, E., und Schleich, F.*: Das magnetische Elektronenmikroskop als Meßgerät zur Kontrolle der Stromquellenkonstanz. Optik 7, 284—289 (1950).
1476. *Le Poole, J. B.*: Electron microscopes. Proc. Conference on Electron Microscopy, Delft, Juli 1949, 21—26 (1950).
1477. *RCA Photophone Ltd.* 36, Woodstock Grove, London W 12: Permanent magnet electron microscope. J. sci. Instruments 27, 339 (1950).
1478. *Wegmann, L.*: Der Aufbau des Trüb-Täuber-Elektronenmikroskops. Optik 7, 263—266 (1950).
1479. *Anonym*: Ein kleines Tisch-Elektronenmikroskop. Umschau 51, 237 (1951). (Beschreibung des RCA-Geräts EMT).
1480. *Eckardt, F.*: Die Technik des OSW-Elektronenmikroskops. Elektrotechnik 5, 32—35 (1951).
1481. *Grivet, P.*: Évolution et aspect actuel du microscope électronique. Biochim. Biophys. Acta 7, 1—18 (1951).
1482. *Ramsauer, C.*: Das elektrostatische Elektronenmikroskop 1951. AEG-Mitteilungen 41, 151 (1951).
1483. *Suschkin, N. G., Plachow, A. G., Kuschmir, Ju. M., Saitzew, P. W., Bertyn, A. R., und Lewkin, N. P.*: Universal - Elektronenmikroskop für 100 kV (UEM-100). Iswestija Akad. Wiss. UdSSR., physikal. Serie 15, 285—293 (1951).
1484. *v. Borries, B.*: Ein magnetostatisches Gebrauchs-Elektronenmikroskop für 60 kV Strahlspannung. Z. wiss. Mikrosk. u. mikr. Technik 60, 329—358 (1952).
- F 3. Beschreibungen von Einzelgeräten**
1485. *Assao, S., Tetu, W., und Seize, T.*: Ein elektrisches Elektronenmikroskop. J. Phys. Math. Soc. Japan 17, 607 (1943).
1486. *Prebus, A. F.*: Combined electron diffraction and microscope apparatus. Physic. Rev. 63, 462 (1943).
1487. *Dupouy, G.*: Ein magnetisches Elektronenmikroskop hoher Auflösung. J. Phys. Radium (Ser. 8) 7, 320 (1946).
1488. *Anonym*: Experimental electron microscope. Engineer 185, 517 (1948).
1489. *Boersch, H.*: Eine Vakuum-Bank. Z. f. Physik 130, 517—520 (1951).
1490. *Miljutin, W. I., Jantschewski, K. M., Fetissow, W., und Rasspletin, K. K.*: Ein Elektronenmikroskop mit elektrostatischen Linsen. (ESM 40). Iswestija Akad. Wiss. UdSSR. phys. Serie 15, 294—305 (1951).
1491. *Ruska, E.*: Über den Aufbau einer elektronenoptischen Bank für Versuche und Demonstrationen. Z. wiss. Mikrosk. u. mikr. Technik 60, 317 bis 328 (1952).
- F 4. Elektronenoptische Bauteile**
1492. *Bowden, C.*: Small apertures in plates. Electronic Engng. 20, 369 (1948).

1493. *Holman, H. E.*: Making small apertures in metal plates. *Electronic Engng.* 20, 186 (1948).
1494. *Anonym*: Electron camera. *Metal Industry* 76, 89 (1950).
1495. *Martin, O.*: Eine Objektträgervorrichtung zur gleichzeitigen Einführung einer großen Zahl von Objekten in das Elektronenmikroskop. *Optik* 7, 333 bis 335 (1950).
1496. *Broadway, J. D.*: A condenser aperture for electron microscopes. *J. appl. Phys.* 22, 104—105 (1951).

F 5. Elektrische Ausrüstung

1497. *Cuckow, F. W.*: Beam current stability in RCA electron microscopes. *Rev. sci. Instruments* 16, 293 (1945).
1498. *Hermendinger, P.*: 200 000 Volt durch neue elektrostatische Hochspannungsgeneratoren. *Elektron (Linz)* 4, 360 bis 361 (1950).
1499. *Panzer, S.*: Erzeugung hoher Gleichspannung mittels Hochfrequenz. *Optik* 7, 290—293 (1950).
1500. *Gleichen, P. H.*: Electrical breakdown over insulators in high vacuum. *J. appl. Phys.* 22, 535—541 (1951).
1501. *Sacharow, G. P., Poliwanow, W. W., und Solotarenko, Ju. W.*: Elektrische Speisungsanordnungen für Elektronenmikroskope. I. Mitt. Allgemeine Anforderungen an die elektrischen Speisungsanordnungen von Elektronenmikroskopen. *Izvestija Akad. Wiss. UdSSR., physikal. Serie* 15, 323—335 (1951).
1502. *Vastel, J.*: Sources modernes à haute tension sous faible débit. *Ann. de Radioélectricité* 6, 84—94 (1951).
1504. *Courtet, R.*: Vacuum molding with simultaneous electron microscope control. *Le Vide* 3, 530 (1948).
1505. *Spangenberg, K. R.*: Vacuum tubes. New York, Toronto, London, McGraw-Hill Book Co. Inc. 1948, 860 S.
1506. *Guthrie, A., und Wakerling, R. K.*: Vacuum equipment and techniques. Buch, erschienen innerhalb National Nuclear Energy Series, herausgegeben 1949 durch McGraw Book Co.
1507. *Guthrie, A.*: Leak detector for industrial vacuum systems. *Electronics* September 1950, 96—101.
1508. *Adam, H.*: Vakuumtechnik. *Feinwerktechnik* 55, 11—20 (1951).
1509. *Lempicki, A., und McFarlane, A. B.*: Silicone oil vapour and secondary electron emission. *Nature* 167, 813 bis 814 (1951).

F 7. Lichtoptische Ausrüstung

1510. *Bishop, F. W.*: Photometer for electron microscope. *Electronics*, Sept. 1950, S. 110—111.
1511. *Frei, E. H., und Hirschfeld, F. L.*: An exposure meter for the electron microscope. *Rev. Sci. Instruments* 22, 231 bis 232 (1951).
1512. *Merling, K. B.*: A binocular magnifier for the electron-microscope for critical viewing and focusing of finest structures (bacteriophage of *B. coli*). *J. Roy. micr. Soc.* 381—387 (1950).

F 8. Handhabung der Geräte

1503. *Jacobs, R. B., und Zuhr, H. F.*: New developments in vacuum engineering. *J. appl. Phys.* 18, 34 (1947).
1513. *Hillier, J., und Ellis, S. G.*: On the visual focusing of an electron microscope. *J. appl. Phys.* 19, 121 (1948).

Zur Fixation elastischer Fasern

Von G. Petry

Mit 4 Abbildungen

Die Unbeeinflussbarkeit des Elastins durch die üblichen Fixierungsmittel führt bei der Beurteilung funktioneller Strukturen besonders dann zu einer gewissen Unsicherheit, wenn die zu untersuchenden elastischen Gerüste bestimmter Organe vermittels einer Fixierung in verschiedenen Dehnungszuständen festgehalten werden müssen.

Wie bereits früher mitgeteilt wurde, verändern die gebräuchlichen Fixierungsmittel die mechanischen Eigenschaften des Elastins nicht (PETRY, 1951).

Wie erheblich bei ungenügender Fixierung die Fehlerquelle werden kann, sei an folgendem Beispiel demonstriert (s. Abb. 1 a u. b)¹⁾: Eine Aorta wurde nach Abbinden aller kleinen Gefäße vom einen Ende her unter Druck mit flüssigem Paraffin gefüllt und dabei formgerecht in allen Dimensionen gedehnt. Darauf wurde das Ende, von dem aus das Paraffin eingefüllt wurde, abgebunden und das Ganze in Formalin zur Fixation gebracht. Nach mehreren Wochen wurden das abgebundene Ende der Aorta descendens und das eines vom Aortenbogen abgehenden Gefäßes abgeschnitten. Nach verhältnismäßig kurzer Zeit zog sich die „fixierte“ Gefäßwand von der Schnittfläche auf die in Abb. 1a deutlich erkennbare Strecke über den Paraffinkern zurück. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß der größte Teil der Aorta sich deswegen noch nicht zurückziehen konnte, weil an den Abgangsstellen der unterbundenen kleinen Gefäße sich Paraffinausgüsse bildeten.



a b
Abb. 1a u. b. Aorta Mensch durch Paraffinfüllung gedehnt und in Formalin „fixiert“

- a) Nach Durchschneidung der abgebundenen Enden zieht sich die Gefäßwand über den Paraffinkern zurück
b) Erneute Retraktion der Gefäßwand nach einem Zirkulärschnitt. Gleiches Objekt wie 1a.

¹⁾ Das Präparat stellte mir Herr Dr. FISCHER zur Verfügung.

Durchschneidet man nämlich die Aortenwand (s. Abb. 1 b) zirkulär bis auf den Paraffinkern, dann retrahieren sich beide Schnittflächen sehr rasch, so daß der in Abb. 1 b sichtbare Spalt entsteht²⁾. Dies läßt sich für die anderen Strecken des Präparates ebenso durchführen.

Nach Herausnahme des Paraffinkerns erfolgt diese Retraktion der Aortenwand selbstverständlich auch in der Querrichtung. Eine Untersuchung struktureller Verhältnisse an gedehnten Gefäßwänden hat diesen Tatsachen Rechnung zu tragen, wenn sie *lege artis* durchgeführt werden soll. Dies gilt besonders für die Aorta.

An der Grenze feinsten elastischer und kollagener Einheiten ist es durchaus möglich, daß das verschiedene physikalische Verhalten dieser Gewebelemente nach der Einwirkung von Fixierungsmitteln die Ursache von Spannungen sein kann. Letztere können zu Kontinuitätsunterbrechungen feinsten Fasern führen, wodurch dann unter Umständen falsche mikroskopische Bilder entstehen. Jedes andere Gewebe schrumpft bei der Fixierung stärker als die elastischen Fasern, was zur Folge haben muß, daß die elastischen Fasern auf einen kleineren Raum zusammengeschoben werden. Sie erscheinen dann gewellt oder geschlängelt, was dem Aussehen in unverletztem und lebensfrischem Zustand sicher nicht entspricht.

Angesichts dieses eigentümlichen Verhaltens des Elastins ist die Forderung nach einer Fixierung, welche die Dehnbarkeit des Elastins aufhebt, besonders dringend. Diese „echte“ Fixation kann jedoch nicht im Sinne einer Eiweißfällung bzw. einer irreversiblen Denaturierung der Elastinmoleküle verstanden werden. Wir haben bis jetzt weder eine genaue Vorstellung von der Anordnung und der Größe der Elastinmoleküle, noch kennen wir den Mechanismus der makromolekularen Verschiebungen, die der physikalischen Eigentümlichkeit des Elastins zugrundeliegen müssen. Trotz dieser mangelhaften Kenntnis über die Natur des Elastins gibt es Möglichkeiten, die elastischen Fasern wenigstens so zu beeinflussen, daß vorübergehend und unter bestimmten Voraussetzungen sogar dauernd ihre Dehnungsfähigkeit aufgehoben werden kann. Dies geschieht durch eine Blockierung der gegenseitigen Verschiebungsmöglichkeiten der Makromolekülketten des Elastins, das als solches nicht verändert wird. Diese Blockierung kann durch eine Dehydratation mit absolutem Alkohol und in idealer Weise durch Behandlung mit Phosphormolybdänsäure erreicht werden.

1. Möglichkeit einer Fixierung elastischer Fasern durch wasserentziehende Mittel.

In wasserentziehenden Mitteln wird das Elastin starr. Das Dehnungsdiagramm solcher Fasern zeigt nur eine Gerade, die sich kaum von der Ordinate abhebt. Nur bei größerer Kraftanwendung ergibt sich am Schluß der Kurve eine plastische Dehnung, die, solange der Fixationszustand andauert, nicht reversibel ist (H. BATZER, und G. PETRY, 1952). Es konnte gezeigt werden, daß die so behandelte elastische Sehne nach Überführung in Wasser ihre Dehnbarkeit vollkommen wiedergewinnt. Auch die während des fixierten Zustandes erfolgte plastische Dehnung wird reversibel (PETRY 1951). Die Anwesenheit von Wasser ist

²⁾ Nachtrag bei der Korrektur: Nach 3 Monaten hat sich dieser Spalt von etwa 5 mm auf 11 mm verbreitert. Das Aortenstück wurde während dieser Zeit in Formalin aufbewahrt.

daher für die Dehnbarkeit der Elastinfasern eine notwendige Voraussetzung³⁾. Für die Fixierung der Elastinfasern im Sinne einer Verfestigung ergeben sich daraus folgende Möglichkeiten. Eine Dehydratation, wie sie z. B. durch hochprozentigen Alkohol erfolgt, hebt die Dehnbarkeit auf. Je vollkommener diese Dehydratation ist, desto widerstandsfähiger wird das Elastin gegenüber Dehnungsversuchen. Sofern man das zu fixierende Objekt bei der Weiterbehandlung nicht mehr in wässriges Milieu bringen muß, kann eine stabilisierende Fixation des Elastins durch 96%igen bzw. absoluten Alkohol erreicht werden. Konzentrationen, die unter 90% liegen, bieten allerdings keine Gewähr mehr für die Erhaltung des betr. Dehnungszustandes. Die Dehydratation ist reversibel. Je mehr Wasser wieder in die Elastinfaser kommt, um so dehnbarer wird sie, was sich natürlich besonders bei der gestreckt fixierten Faser auswirken muß.

Soll ein Elastingerüst, etwa das einer Vene oder Arterie, in gedehntem Zustand untersucht werden, so kann die Färbung in Resorcin-Fuchsin bereits in die aufsteigende Alkoholreihe eingeschaltet werden, wenn das Präparat dabei im gedehnten Zustand gehalten wird; denn der Dehnungszustand ist erst in absolutem Alkohol unveränderlich.

Schließen wir das Objekt als Totalpräparat ein, dann wird es sogar noch in Xylol oder Wintergrünöl in gedehntem Zustand gehalten. Objekte, die in Paraffin eingebettet werden, läßt man am besten bis zur Einblockung aufgespannt, was sich auch für andere Häutchenpräparate als vorteilhaft erwiesen hat (PETRY 1950).

Wird ein in Alkohol gespannt fixiertes Objekt nachträglich wieder in Wasser gebracht, dann kann es an den Verankerungen feiner elastischer Fasern zu Abrissen kommen, da sich gedehnte elastische Fasern nun wieder retrahieren, aber das übrige Gewebe starr bleibt. Ein elastisch-muskulöses System eines solchen Häutchenpräparates, das in seinen Verankerungen gedehnt und in diesem Zustand fixiert wurde, kann daher nach Wässerung zum Teil sehr wesentlichen Spannungsdifferenzen ausgesetzt sein. Die Muskulatur, die kollagenen und argyrophilen Fasern verändern sich nicht mehr. Sie bleiben auch, wenn sie ins Wasser zurückgebracht werden, infolge der vorausgegangenen Denaturierung ihrer Eiweißbausteine starr. Die gespannte Elastinsehne jedoch wird sehr rasch wieder dehnbar und in dem Maße, in welchem sie Wasser aufnimmt, gewinnt sie ihre durch die Alkoholwirkung vorübergehend blockierte Retraktionskraft zurück. Damit entstehen an den Enden der Sehne erhöhte Spannungen. Man kann häufig bei solchen Häutchenpräparaten beobachten, daß die Muskulatur und die kollagenen Fasern gestreckt fixiert sind, während die feinen Elastinfasern durch Abrisse an manchen Stellen starke Wellungen aufweisen. In einer früheren Mitteilung (PETRY, 1951) wurde darauf hingewiesen, daß sogar nach Paraffineinbettung die reversible Dehnbarkeit der Elastinfasern in vollem Umfange wieder erscheint, wenn das Objekt nach Entparaffinierung in Wasser gebracht wird. Die Elastinfasern eines Paraffinschnittes verhalten sich bei der Überführung in wässriges Milieu selbstverständlich genau so, wie die oben beschriebenen Elastinsehnen des Häutchenpräparates. Es spielt keine Rolle, ob das Objekt z. B. zuerst in Formalin fixiert und dann in

³⁾ Die von mir 1951 auf dem Heidelberger Anatomenkongreß vorgetragenen und in einem Film demonstrierten Eigenschaften des Elastins bezüglich der Bedeutung des Wassergehaltes auf ihre Dehnungsfähigkeit finden ihre Bestätigung durch die Arbeit von G. F. BAHR, 1951.

Alkohol gehärtet wurde. Die Anwesenheit von Kollagen und Muskulatur verhindert natürlich, daß sich grobe Verschiebungen innerhalb eines Gewebsbezirkes bemerkbar machen. Das ändert jedoch nichts an der Tatsache, daß das Elastin wieder dehnbar geworden ist und sich nunmehr im Wasser so verhält, wie es oben geschildert wurde. Enthält also ein Objekt, das in einem gedehnten Zustand wie üblich fixiert und in Paraffin eingebettet wurde, Elastinfasern, dann werden diese beim Herstellen von Schnitten an irgendeiner Stelle durchtrennt. Kommt ein solcher Schnitt in wässriges Milieu, dann ziehen sich die Elastinfasern entsprechend der nun erfolgenden Wasseraufnahme zusammen und werden wellig oder

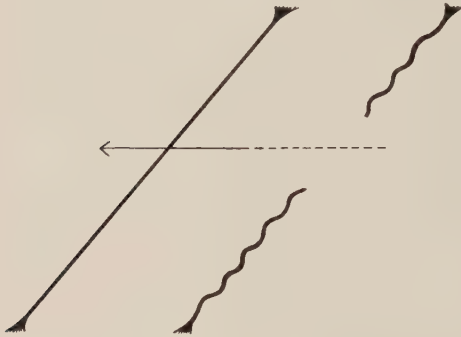


Abb. 2. Schema: Eine gedehnt in Alkohol fixierte elastische Sehne (links) retrahiert sich nach Durchschneidung und anschließender Wässerung und wird wellig (rechts)

spiralig (Abb. 2). Ist die bei dickeren Schichten angestrebte Gewebskontinuität erhalten, so verhalten sich die Spannungsunterschiede wie beim Häutchenpräparat (siehe oben). Darüber hinaus kommt es aber zu einem Phänomen, das bei der Herstellung von Schnittpräparaten oft genug Ärger und Mühe bereitet: Die aufgeklebten Schnitte schwimmen im Wasser ab! Dies ist besonders bei dicken, viel Elastin enthaltenden Schnitten der Fall. Die Erklärung ist durch das eigentümliche Verhalten der Elastinfasern gegeben.

Spannungsdifferenzen treten, allerdings in geringerem Maße, auch im ungedehnt fixierten Präparat auf. Als

Beispiel sei wieder die Kombination Muskulatur-Kollagen-Elastin angenommen. Fixiert man beispielsweise in Alkohol-Formol, dann werden Muskulatur und Kollagen fest und schrumpfen. In gleichem Maße werden dadurch die elastischen Fasern gedehnt werden, die ja noch bis in 90%igem Alkohol einigermaßen dehnbar sind. Dies bedeutet, daß sich während des Fixationsprozesses selbst innerhalb des Elastins Spanningskräfte entwickeln. Solange der Fixierungsprozeß und die damit verbundene Schrumpfung aller nichtelastischen Elemente noch nicht abgeschlossen sind, besteht daher die Möglichkeit, daß feine Bindegewebsverankerungen reißen können. Nach abgeschlossenem Fixierungsprozeß und nach vollzogener Dehydratation während der Einbettung können sich gedehnte elastische Fasern nicht mehr zusammenziehen. Ihre innere Spannung ist durch die Blockierung auf Null herabgesunken. Sobald sie aber nach der Entparaffinierung gewässert werden und damit ihre Blockierung aufgehoben wurde, steigt ihre Spannung und somit ihre Retraktionskraft entsprechend dem Grad der vorangegangenen Dehnung. Es entstehen je nach der Anzahl der Größe der im Schnitt vorkommenden elastischen Fasern feinere oder gröbere Verschiebungen. Sie können dazu führen, daß der Schnitt abschwimmt, wie dies beispielsweise besonders häufig bei dicken Lungenschnitten der Fall sein kann. Das Auftreten von Wellen in einem

Schnittpräparat hat die gleichen Ursachen. — Meines Erachtens ist die Berücksichtigung dieser Tatsachen bei der Darstellung feinerer Strukturen von Bedeutung. Die Fixationsmethode des Elastins durch Alkohol ist nur auf den Wasserentzug zurückzuführen. Ihr Nachteil liegt darin, daß man wässriges Milieu meiden muß. Damit ist es auch unmöglich, Gegenfärbungen in wässrigen Farblösungen durchzuführen.

2. Fixierung des Elastins durch Phosphormolybdänsäure

Bei der Suche nach einem geeigneten Fixierungsmittel für Elastin fiel nach Überprüfung vieler Fixierungsflüssigkeiten und sonstiger Agenzien die Phosphormolybdänsäure durch ihre festigende Wirkung auf. Die als Untersuchungsobjekt verwendete elastische Flughautsehne (Tauben) verhartet, nachdem sie maximal gedehnt der Einwirkung einer 1%igen Phosphormolybdänsäure ausgesetzt war, in diesem Dehnungszustand. Eine Wässerung ändert daran nichts. Die Verfestigung des elastischen Materials durch Phosphormolybdänsäure hat andere Ursachen als die, die durch Alkohol erreicht wurde. Es handelt sich hier um eine Adsorption der Phosphormolybdänsäure an das Elastinmolekül. Besondere Stellen der Elastinmoleküle, wahrscheinlich die Hydratationszentren, müssen dabei blockiert werden. Anscheinend sind diese Stellen auch für die gegenseitigen Bewegungen der Molekülketten, die zur Dehnung des Elastins notwendig sind, von entscheidender Bedeutung. Eine Adsorption von Phosphormolybdänsäure an diesen Punkten blockiert wahrscheinlich den Entfaltungsmechanismus der Molekülketten. Man kann sich vorstellen, daß durch die Adsorption der Phosphormolybdänsäuremoleküle die Zwischenräume zwischen den Elastinmolekülketten ausgefüllt werden. Dies drückt sich auch im Verhalten der elastischen Fasern gegenüber polarisiertem Licht aus. Im gedehnten Zustand ist das Elastin, wie W. J. SCHMIDT (1939) gezeigt hat, doppelbrechend. Nach Behandlung mit Phosphormolybdänsäure bleibt die gedehnte Faser jedoch isotrop wie die unge-



Abb. 3. Polarisationsoptisches Verhalten elastischer Sehnen, die gedehnt mit Phosphormolybdänsäure fixiert wurden. In der Mitte eine kollagene Kontrollsehne, die aufleuchtet. Zu beiden Seiten extrem gedehnte elastische Sehnen, die isotrop bleiben. Achsen der Nikols entsprechen den Bildrändern

dehnte (siehe Abb. 3), obwohl durch die Dehnung der Faser die für die Durchlässigkeit des polarisierten Lichtes sonst notwendige Parallelstellung der Molekülketten hergestellt wurde. Dies bedeutet, daß die Zwischenräume jetzt von Phosphormolybdänsäure ausgefüllt sein müssen.

Nun gelingt es durch Behandlung mit starken Ammoniakdämpfen die Phosphormolybdänsäure aus den Elastinfasern herauszulösen. Es kommt dabei zur Bildung von Molybdänsalzen die wasserlöslich sind. In dem Maße, in dem die Phosphormolybdänsäure auf diese Weise aus der gedehnten Faser entfernt wird, erfolgt der Umschlag von der Isotropie zur normalen Anisotropie des gedehnten Zustandes. Die gedehnte elastische Faser leuchtet dann im polarisierten Licht genau so auf wie die unbehandelte. Gleichzeitig wird sie wieder reversibel dehnbar. Demnach ist eine Verfestigung des Elastins mit Phosphormolybdänsäure letzten Endes auch ein reversibler Vorgang. Dieser ist aber an starke Alkalien, z. B. längere Behandlung mit starken ammoniakalischen Lösungen, gebunden, die mit Ausnahme bei der Versilberung meistens keine Verwendung finden.

Für den Fixationsgang selbst sind folgende Einzelheiten von Interesse: Die Konzentration der Phosphormolybdänsäure beträgt 1%, höchstens 2% der wässrigen Lösung, die verschlossen unbegrenzt haltbar ist. Sie läßt sich mit anderen Fixierungsflüssigkeiten mischen (1%ig bis 2%ig), ohne daß ihre festigende Wirkung auf das Elastin verloren geht. Im Hinblick auf das früher bereits dargestellte Verhalten des Elastins gegenüber den üblichen Fixierungsmitteln, kennen wir zur Zeit außer der Phosphormolybdänsäure keine Fixierungsflüssigkeit, bei der wir in der Lage sind, Bindegewebsstrukturen, die viel Elastin enthalten, in extremen Funktionszuständen wirklich festzuhalten⁴⁾.

Die Fixierung des Bindegewebes mit Phosphormolybdänsäure hat eine gewisse Ähnlichkeit mit der Gerbung, wie sie z. B. mit Quebracho durchgeführt wird⁵⁾. Die Gerbung wird neuerdings als eine „dehydratisierende Weichmachung“ definiert (H. BATZER, und G. WEISSENBERGER, 1952), wobei unter Weichmachung in der Gerbereichemie ein Vorgang verstanden wird, bei dem das Leder u. a. eine gewisse Biegsamkeit und eine bestimmte Weichheit erhält. Für die Fixation bindegewebiger Strukturen, besonders wenn man sie präparatorisch weiterbehandeln will, ist eine solche „Weichmachung“ von großem Vorteil. Die Elastinfaser wird nach Alkoholentwässerung, in Xylol und Benzol außerordentlich spröde und bricht bei geringster Biegsbeanspruchung. Sie verhält sich dabei genau so wie eine getrocknete und eignet sich zur Präparation nicht. Die für die Präparation elastischer Fasern und Sehnen notwendige Biegsamkeit und Weichheit bei gleichzeitiger Stabilisierung des Dehnungszustandes wird jedoch von der Phosphormolybdänsäure in ausreichendem Maße erfüllt.

Elastische Gerüste können mit Hilfe der Phosphormolybdänsäurefixierung auch sehr leicht in extremen Dehnungszuständen dargestellt werden. Wir können z. B. das elastische Gerüst einer Aorta nach Abbinden der abgehenden Gefäße durch Füllung und Einlegen in Phosphormolybdänsäure in einen extremen Dehnungszustand bringen. Man kann Stücke ohne weiteres in Paraffin einbetten und

⁴⁾ Ich verweise auch auf die von H. FISCHER auf dem Anatomenkongreß 1952 in Marburg vorgetragenen Untersuchungen über den funktionellen Bau der Trachea.

⁵⁾ Wird eine elastische Sehne in gedehntem Zustand mit Quebracho (pflanzliches Gerbmittel) gegerbt, dann verhält sie sich polarisationsoptisch ebenso (BATZER und PETRY, 1951).

Schnitte entsprechend färben, ohne daß der Dehnungszustand der elastischen Gerüste sich ändert. (Vgl. dagegen die in Formalin „fixierte“ Aorta, Abb. 1). Hat man genügend Schnitte dieses Dehnungszustandes, dann kann man sehr leicht den entgegengesetzten erhalten: Entparaffiniert man und führt das Objekt durch die absteigende Alkoholreihe in Ammoniakwasser, dann zieht sich die gedehnte Aorta erheblich zusammen (Abb. 4a und 4b), entsprechend der wiedergewonnenen Retraktionskraft der elastischen Fasern⁶⁾. In diesem Zustand wird das Objekt dann wieder neu in Paraffin eingebettet und man erhält von der Anschnittfläche,

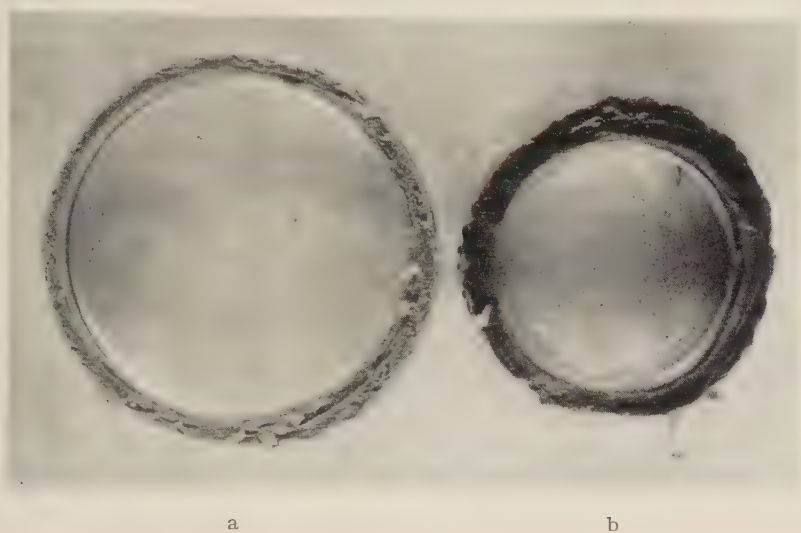


Abb. 4. Aufhebung der durch Phosphormolybdänsäure blockierten Dehnbarkeit elastischer Elemente in einer Aortenwand (Rind)

- a) Ring aus der extrem gedehnt in Phosphormolybdänsäure fixierten Aorta, die in Paraffin eingebettet wurde.
- b) Nachbarrang von a) entparaffiniert und mit Ammoniakwasser behandelt. Das elastische Gerüst wird wieder dehnbar und der Aortenring wird enger

von der man vorher in extrem gedehntem Zustande Schnitte gewonnen hatte, nunmehr solche im Zustand weitmöglichster Zusammenziehung oder Entspannung der elastischen Gerüste.

Die färberische Darstellung der Gewebelemente gelingt nach Phosphormolybdänsäure-Behandlung oft nicht so gut, wie bei den sonst üblichen Fixierungsmethoden. Dazu kommt eine sich ausschließlich am Elastin bemerkbar machende Umkehr des Farbeffektes. Bei Anwendung von Fixierungsgemischen mit Zusatz von Phosphormolybdänsäure ist dies weniger der Fall als bei Behandlung mit

⁶⁾ Es kann auch durch diesen Versuch demonstriert werden, wie sehr sich der Dehnungszustand einer ungenügend fixierten Aorta während der histologischen Verarbeitung verändern kann. Untersuchungsbefunde über die Anordnung von Wandbestandteilen der Aorta bei verschiedenen Dehnungszuständen sind zumindest einer eingehenden Nachprüfung zu unterziehen, wenn sie diese Tatsachen bei der Fixierung des Materials nicht berücksichtigten.

reiner Phosphormolybdänsäure. Durchschnittlich ist die Färbungsdauer gegenüber den Färbungen nach den üblichen Fixierungen erhöht. Durch Haematoxylin (EHRlich) tritt die bereits geschilderte elektive Färbung der elastischen Fasern auf (PETRY 1952). Desgleichen färbt Galloeyanin das Elastin tiefblau. Resorcin-Fuchsin läßt zeitweilig die elastischen Fasern nicht so intensiv hervortreten, wie es sonst der Fall ist. Deswegen wurde zur Darstellung elastischer Fasern mit Resorcin-Fuchsin und gleichzeitiger Fixierung mit Phosphormolybdänsäure zunächst das im gewünschten Dehnungszustand gehaltene Präparat im Stück gefärbt. Nach entsprechender Durchdringung der Gewebe und Differenzierung wurde dann mit Phosphormolybdänsäure nachfixiert. Je nach Wunsch kann dann das Objekt ohne die Gefahr einer Veränderung des Dehnungszustandes in Wasser oder zur Einbettung über die aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin gebracht werden. Selbstverständlich richten sich die bei speziellen Untersuchungen zu treffenden Maßnahmen nach der Besonderheit des zu untersuchenden Objektes und nach dem Ziel, das eine solche Fixierung erreichen soll. Untersuchungen über Färbungen nach Phosphormolybdänsäurefixation sind im Gange.

Zusammenfassung

Für die Beurteilung funktioneller Strukturen, die Elastinfasern enthalten, ist die Aufhebung der Dehnungsfähigkeit letzterer unerläßlich. Es werden dazu zwei Möglichkeiten beschrieben, die Dehydratation durch absoluten Alkohol, eine nicht allen Anforderungen gerecht werdende Methode, und die Fixierung mit 1%iger Phosphormolybdänsäure. Letztere Methode ist für die Fixierung d. h. die Verfestigung des Elastins, vorläufig die Methode der Wahl. Es wird auch die Umkehr des polarisationsoptischen Verhaltens der gedehnten, mit Phosphormolybdänsäure behandelten Elastinfaser hingewiesen.

Schrifttum

- BAHR, G. F.: Über die Feinstruktur elastischer Fasern. *Z. f. Anat. u. Entw.-Gesch.* Bd. 116, S. 134/1951. — BATZER, H., u. G. WEISSENBERGER: Gerbversuche mit Polyamiden. „Die makromolek. Chemie“ Bd. VII, H. 3 S. 320/1952. — BATZER, H., u. G. PETRY: Über Gerbung und Entgerbung von elastischen und kollagenen Fasern. „Die makromolekulare Chemie“ Bd. VII, H. 3, S. 328/1952. — FISCHER, H.: Beitrag zur funktionellen Struktur der Trachea. *Verhandl. d. Anat. Ges.* 1952, im Druck. — PETRY, G.: Über die Formen und die Verteilungen elastisch-muskulöser Verbindungen in der Haut der Haustaube. *Morph. Jahrbuch* Bd. 91, H. 4, S. 511/1950. — PETRY, G.: Die Dehnbarkeit der unfixierten und „fixierten“ elastischen Faser. *Z. f. Zellf.* Bd. 36, S. 333/1951. — PETRY, G.: Beitrag zur Kenntnis der elastischen Fasern und Sehnen. *Verh. d. Anat. Gesellsch.* 1951, S. 138. — PETRY, G.: Über die elektive Färbung elastischer Fasern mit Hämatoxylin. *Z. f. wiss. Mikrosk. und mikrosk. Technik*, im Druck. — SCHMIDT, W. J.: Einige Unterrichtsversuche zur Doppelbrechung der Elastinfasern. *Kolloid Z.* Bd. 89, S. 333/1939.

[Eingegangen am 14. Juni 1952]

Aus dem Obst- und Versuchsgut „Höfchen“ der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, und dem Botanischen Institut der Universität Köln

Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachs-Gemischen“ unter Umgehung der Alkoholstufen, besonders nach Imbibition von leicht wasser- und lipoidlöslichen Stoffen

Von **Helmut Tietz**

Mit 3 Abbildungen

Einleitung

Um in histologischen Schnittpräparaten Fette und Lipide nachzuweisen, sind zwei Methoden bekannt: 1. auf dem Gefriermikrotom das frische Präparat unbehandelt zu schneiden und 2. sich der Gelatineeinbettung nach GASKELL, sowie HERINGA und TEN BERGE (7) zu bedienen. Die Gelatineeinbettung führt allgemein zu befriedigenden Resultaten. Schwierigkeiten können jedoch in größerem Maße bei der Färbung entstehen, da sich die Gelatine nicht immer restlos herauslösen läßt. Weiterhin ist für die Gelatineeinbettung ein Gefriermikrotom unerlässlich. Der Nachteil des Gefriermikrotoms besteht darin, daß sich mit ihm keine Bänder schneiden lassen. Man erhält daher keine aufeinanderfolgenden Schnittserien.

Bei den verschiedenen Problemstellungen, die heute in der Biologie vorliegen, ist die Forderung nach einem schonenden, wenn möglich leicht wasserlöslichen Einbettungsmedium, d. h. unter vollständiger Umgehung der Alkoholstufen, immer stärker in den Vordergrund getreten. Es kommt nicht nur darauf an, Fette und Lipide, die von Natur aus im Gewebe vorhanden sind, aufzuzeigen, sondern auch imbibierte und injizierte wasser- bzw. lipoidlösliche Stoffe in der Zelle zu lokalisieren. Oft geht es auch um Strukturerhaltungen in größeren Gewebeverbänden oder Organen (z. B. Insektenkutikula), die durch die Paraffineinbettung mit ihren hochkonzentrierten Alkoholstufen und dem Benzol stark deformiert werden. Schließlich setzt sich die Verwendung von radioaktiven Stoffen in der Biologie in Deutschland immer mehr durch. Damit tritt die Frage nach einer schnellen und schonenden Einbettungsmöglichkeit für die Anfertigung von Autoradiographien ganz besonders in den Brennpunkt des Interesses. Es hat sich gezeigt, daß ein hoher Prozentsatz der radioaktiven Substanzen bei der langwierigen Behandlung mit den herkömmlichen Fixierungsmitteln und der darauffolgenden Einbettung in Paraffin (unumgängliche Alkoholstufen) aus dem Gewebe ausgewaschen wird und so für die Autoradiographie verloren ist.

Historischer Überblick

Seit dem Jahre 1949 sind von H. BLANK (2, 3, 4) verschiedene Veröffentlichungen über Schnelleinbettungsmethoden mit wasserlöslichen Wachsen unter Umgehung der Alkoholstufen erschienen. Es handelt sich bei diesem Einbettungsmedium um Polyäthylenglycole, die unter dem Namen „Carbowaxe“ in der amerikanischen Literatur beschrieben sind. BLANK verwendet ein „Carbowax“-Gemisch von neun Teilen Carbowax 4000 und einem Teil Carbowax 1500. (Die Zahlen geben jeweils die Molekulargewichte der Stoffe an.) Die fixierten und gewässerten Präparate gibt BLANK in ein solches Gemisch, das eine Temperatur von 55° C hat. Die Objekte werden hierin zunächst leicht bewegt und das Gemisch wird in Abständen von einer Stunde dreimal gewechselt. Bei der letzten Stufe verwendet BLANK ein geeignetes Gefäß, um die Objekte darin nach Beendigung der Infiltration in Eiswasser erstarren zu lassen. Die eingebetteten Stücke können sofort auf dem Mikrotom geschnitten werden. So hat BLANK die Einbettung innerhalb von drei Stunden vollzogen und ist bereits nach fünf Stunden im Besitz von fertigen Schnittpräparaten. BLANK hat in seinen Arbeiten nur tierisches Gewebe behandelt.

Von verschiedenen Seiten war jedoch immer wieder zu erfahren, daß bei der Methode, wie sie von BLANK (3) erarbeitet worden ist, die histologischen Präparate starke Schrumpfung zeigen.

Um bei der Anfertigung von Autoradiographien die Auswaschung der applizierten radioaktiven Substanzen während der üblichen histologischen Vorbehandlung zu vermeiden, hat R. S. RUSSELL (8) das zu untersuchende Gewebe in auf - 70° C gekühlten abs. Alkohol übertragen, der dann nur langsam in das Gewebe eindringt. Später wandelt BLANK (4) diese Technik dahingehend ab, daß er tiefgekühltes Propylenglycol unterhalb von - 20° C nimmt, und damit die wasserlöslichen Stoffe im Gewebe zurückhält. Hieran schließt er die Einbettung über drei „Carbowax“-stufen von je einer Stunde.

Eigene Untersuchungen

„Carbowaxe“ sind in Deutschland noch nicht im Handel und nur sehr schwierig zu beschaffen. Es standen für die hier veröffentlichten Untersuchungen Stoffe mit ähnlichen Eigenschaften zur Verfügung. Es handelt sich ebenfalls um Polyäthylenglycole. Sie werden seit einiger Zeit bei den Farbenfabriken „Bayer“ in Leverkusen hergestellt und sind in verschiedenen Härtegraden unter dem werksinternen Namen „Synthawachs“ mit der entsprechenden Typenbezeichnung erhältlich¹⁾. In Anlehnung an BLANK (2, 3, 4) konnte mit Synthawachs und Äthylenglycol, bzw. Synthawachs allein, durch Einschalten von verschiedenen Konzentrationsstufen des Synthawachses eine außerordentlich schonende und nur zu geringen Schrump-

¹⁾ Herrn Dr. SCHNELL von den Farbenfabriken „Bayer“, der mir freundlicher Weise „Synthawachs“ in den verschiedensten Härtegraden bereitstellte, möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken.

ungen führende Einbettungsmethode aufgefunden werden. Einmal eignet sie sich für die Anfertigung von Autoradiographien und zum anderen für eine einfache Präparation zur Erhaltung von Fetten und Lipoiden im Gewebe.

Handelt es sich um eine Präparation, bei der es nur darauf ankommt, Fette und Lipoide im Gewebe zu erhalten, so bedient man sich einer Fixierungsflüssigkeit, die kein organisches Lösungsmittel (Alkohol, Chloroform usw.) enthält, wie z. B. Bouin, Helly (1) usw. Nachdem die Objekte gewässert sind, werden sie in ein Synthawachs-Wassergemisch von 1 : 1 gegeben. In dieser Stufe verbleiben sie zwei Stunden lang und werden dann je nach der Beschaffenheit des Materials drei bis neun Stunden in reinem Synthawachs belassen. Die Temperatur für das Synthawachs darf nicht mehr als 48° bis 52° C betragen, da sonst die Schrumpfungen der Objekte zu stark werden. Zweckmäßig verflüssigt man das Wachs zuvor bei etwa 60° C und läßt es dann bis auf etwa 40° C abkühlen.

In dem vorangegangenen Kapitel ist bereits darauf hingewiesen worden, daß bei der Anfertigung von Autoradiographien die übliche Vorbehandlung des Gewebes nicht durchführbar ist. Die Behandlung des Gewebes, wie sie RUSSELL (7) vornimmt, bringt methodische Schwierigkeiten mit sich, da nicht an allen Orten ohne größeren Aufwand mit so extremen Temperaturen gearbeitet werden kann. Das gleiche gilt auch für die verbesserte Methode von BLANK, der bei einer Kühlung unterhalb von -20° C noch ein Trockeneis-Methylalkohol-Gemisch benötigt.

Wie die eigenen Versuche ergeben haben, genügt es durchaus bei einer Temperatur von -20° C (Kochsalz-Eisgemisch) zu arbeiten. Das Wasser im Gewebe gefriert sofort und wird nur langsam vom Glycol ausgetauscht. Es kann also kein augenblicklicher Wasserentzug eintreten. Damit wird auch das Auswaschen von wasserlöslichen Substanzen nahezu restlos verhindert. Diese Art der Behandlung wird an Stelle der normalen Fixierung gesetzt. Hierauf folgt dann die eigentliche Einbettung.

In Synthawachs eingebettete Objekte werden mit dem gewöhnlichen Mikrotom geschnitten. Es lassen sich für botanische Präparate leicht Schnittbänder in einer Dicke von 10 bis 20μ herstellen. Zoologische Präparate kann man bis zu 2μ Mikrotomeinstellung schneiden. Inwieweit dieser neue Stoff in der Lage sein wird, die Paraffineinbettung zu verdrängen, soll hier nicht diskutiert werden. Die Zeitersparnis ist außerordentlich groß; denn gerade für botanische Objekte benötigt man bei der Paraffineinbettung 4 bis 5 Tage. Die Synthawachseinbettung dauert einschließlich der Äthylenglycolstufe nur insgesamt 14 Stunden bei großen bzw. schwer zu durchtränkenden botanischen Objekten.

Bei der überaus günstigen Konsistenz, die das Synthawachsgemisch hat, bereitet es keine Schwierigkeiten, die eingebetteten Objekte so zu schneiden, daß die Bänder sich nicht zusammenschieben. Zusammengeschobene Bänder lassen sich schwer wieder strecken, bzw. ist die Gefahr sehr groß, daß bei dem Strecken mit einer wässrigen Flüssigkeit die Schnitte auseinanderschwimmen. Von H. W. WADE (9) sind in einer längeren Ausführung viele Lösungsmittel für die Streckung

und das Aufkleben beschrieben worden. Jedoch konnte er keine restlos zufriedenstellende Methode ermitteln. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Schnitte sich gut aufkleben lassen, wenn die Schnittbänder nicht zusammengeschoben sind. Die Objektträger werden nach APÁTHY (1) hergerichtet, die Bänder aufgelegt und das Synthawachs erwärmt und mittels einer 10%igen Synthawachslösung herausgelöst. Die Synthawachslösung besteht aus 9 Teilen Aqua dest., das zuvor mit Thymol abgesättigt ist, und 1 Teil Synthawachs. Die



Abb. 1. Nach der beschriebenen Methode aufgeklebte Schnittbänder
Objekt: *Lebistes reticulatus*

1 Teil Synthaöl 6075 = Mol.-Gew. 700.

Weitere Versuche sind mit dem Synthawachs 5090 B

= Mol.-Gew. 2520, Verflüssigungsp. 38 bis 50° C

zu empfehlen. Es hat eine sehr feste Konsistenz und der Erwärmungsgrad kann wesentlich niedriger gehalten werden. Für zarte Objekte, wie z. B. Wurzelspitzen oder Griffel scheint es durchaus angebracht, andere Mischungsverhältnisse, bzw. das Synthawachs 5090 B rein zu erproben. Weiterhin kann die Methode dadurch verfeinert werden, daß die Objekte zunächst in Wasser, bzw. Äthylenglycol gegeben werden, dem man langsam Synthawachs hinzusetzt, bis die Konzentration 1:1 erreicht ist.

Zu bemerken ist noch, daß das Synthawachs unter Verschuß aufbewahrt werden muß, da es hygroskopisch ist. Es wird sonst leicht schmierig und verliert seine feste Konsistenz. An der Oberfläche schmierig gewordenenes Synthawachs erhält im Exsikkator bald wieder seine Festigkeit.

Eingebettetes Material konnte, unter Verschuß aufbewahrt, nach einem Vierteljahr ohne Schwierigkeiten auf dem Mikrotom geschnitten werden.

Schnitte haften fest, sind optimal gestreckt und halten alle weiteren Prozeduren gut aus (Abb. 1).

Bevor die Methoden im einzelnen mitgeteilt werden, sollen an dieser Stelle noch einige Worte über das Mischungsverhältnis des Synthawachs gesagt werden. Das bisher günstigste Verhältnis ergab eine Mischung von

9 Teilen Syntha-
wachs 5090 A

= Mol.-Gew. 4000,

Verflüssigungsp. 45
bis 50° C

und

I. Die Anfertigung von histologischen Präparaten nach vorangegangener Fixierung

1. Nach dem Auswässern des Fixierungsmittels werden die Objekte in auf 30° C vorgewärmtes Synthawachs-Wassergemisch 1:1 für 2 Stunden bei 40° C in den Paraffinschrank gesetzt.
2. Die nächste Stufe ist reines Synthawachs-Gemisch. Hierin verbleiben die Objekte 3 bis 9 Stunden. Evtl. ist es zweckmäßig, während dieser Zeit die Stufe noch einmal zu wechseln; besonders dann, wenn durch die Vielzahl oder die Größe der Objekte die Gefahr des Verwässerns besteht.
3. Nach diesem Zeitraum wird flüssiges Synthawachs in geeignete Formen gegossen. Man überträgt die Präparate und bringt das Synthawachs in Eiswasser zum Erstarren.
4. Die Blocks werden für das Mikrotom genau wie bei der Paraffineinbettung hergerichtet und zu Bändern geschnitten.
5. Die Objektträger werden nach APÁTHY (1) präpariert²⁾ und müssen nach dem Erhitzen nahezu trocken sein! Wenn der Objektträger erkaltet ist, werden die Schnittbänder aufgelegt und gerichtet. Nun legt man das Tragglas auf einen Wärmetisch von etwa 30° C und wartet, bis das Synthawachs restlos geschmolzen ist. Dabei strecken sich die Schnitte. (Falten ziehen sich nicht aus! Darum ist es wichtig, ein nicht zusammengeschobenes Schnittband zu haben.) Zum Herauslösen des Synthawachses fertigt man sich eine 10%ige Synthawachslösung in mit Thymol abgesättigtem Aqua dest. an. Ein Filtrierpapierstreifen in Objektträgergröße wird mit dieser Lösung gut angefeuchtet und auf die Schnitte gelegt. Mit einem zweiten Tragglas wird das Filtrierpapier leicht ange-drückt, so daß von unten her betrachtet, keine Luft mehr zwischen Filtrierpapier und Objektträger ist. Das Präparat wird bei 30° C getrocknet (1½ bis 1 Stunde). Das Filtrierpapier liegt jetzt lose auf den Schnitten.
6. Die aufgeklebten Schnitte können je nach ihrem Verwendungszweck gefärbt, durch Alkoholstufen usw. geführt werden.

II. Die Anfertigung von Schnittbändern für Autoradiographien ohne eigentliche Fixierung

1. Das zur Präparation vorgesehene Objekt wird in 2-5 mm große Stücke geschnitten. Die Stücke werden, wenn notwendig, mit der Wasserstrahlpumpe entlüftet und anschließend in Äthylenglycol von - 20° C gebracht. Hierin verbleiben die Objekte 1 bis 3 Stunden. Es läßt sich deutlich das Eindringen des Glycols im Gewebe verfolgen. Als Kältespender genügt ein Kochsalz-Eisgemisch. Um die Temperatur während der langsamen Entwässerung halten zu können, benutzt man zweckmäßig ein kleines Dewar-Gefäß.

²⁾ Bei dem von den Farbenfabriken „Bayer“ in Leverkusen hergestellten und hier verwendeten „Serumglycerin“ haften die Schnitte sehr viel besser, als bei Gebrauch von selbst angefertigtem Eiweißglycerin.

2. Nachdem die in dem Glycol befindlichen Objekte langsam auf Zimmertemperatur erwärmt worden sind, werden sie in ein Äthylenglycol-Synthawachsgemisch 1 : 1 übertragen, das zunächst eine Temperatur von 25—30° C hat. Hierin verbleiben sie 2 Stunden lang bei 50° C im Paraffinschrank.
3. Jetzt erfolgt die Infiltration in reinem Synthawachs ebenfalls bei einer Temperatur von 50° C. Die Dauer beträgt 3—9 Stunden je nach Art des Objektes.

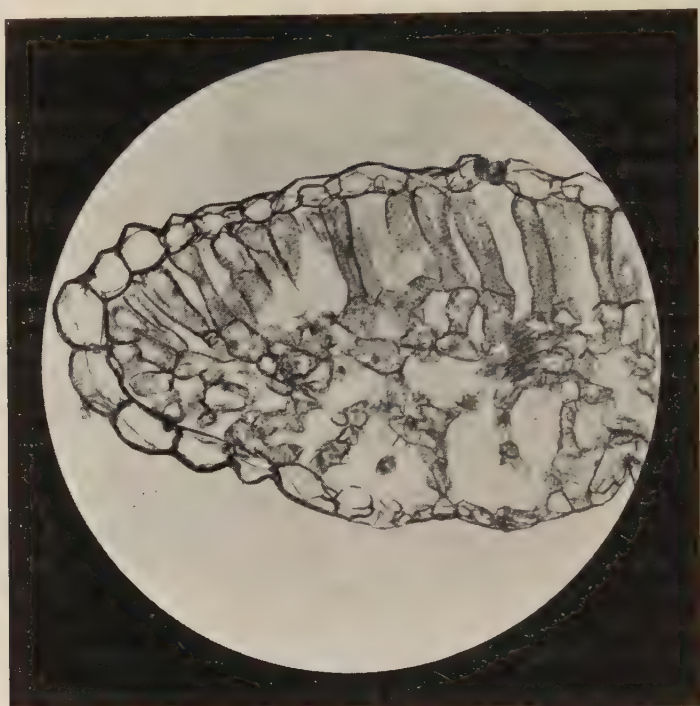


Abb. 2. Querschnitt durch das Blatt von *Vicia faba* 15 μ Mikrotomeinstellung, mit Lichtgrün gefärbt. Vergrößerung: ≈ 60 fach

4. Weiterbehandlung wie I, 3 bis I, 5.
5. Die aufgezogenen Schnitte können so für die Autoradiographie mit Hilfe des Stripping-Filmes weiter präpariert werden (5), oder nach dem Verfahren von BLANK entfällt Punkt I, 5, und jeder Schnitt wird zuvor mit einer dünnen Schicht flüssigen Synthawachses überzogen und dann einzeln auf eine Photoplatte aufgepreßt (4). Ein genaues Studium der hier zitierten Literatur wird für die Präparierung von Autoradiographien dringend empfohlen.

Die Ergebnisse beider Methoden sind für botanische und zoologische Objekte recht befriedigend. Es wurden Wurzel, Sproß und Blatt von *Vicia faba* und *Solanum tuberosum* präpariert. Bei den zoologischen Objekten wurden ausgewählt:

1. Die Cuticula von *Periplaneta americana*, 2. die Cuticula der Rinderdasselfliegen-

larve (*Hypoderma bovis*) und 3. Querschnitte von jungen Fischen (*Lebistes reticulatus*). Auch bei den zoologischen Objekten konnten ausgezeichnete Resultate erzielt werden.

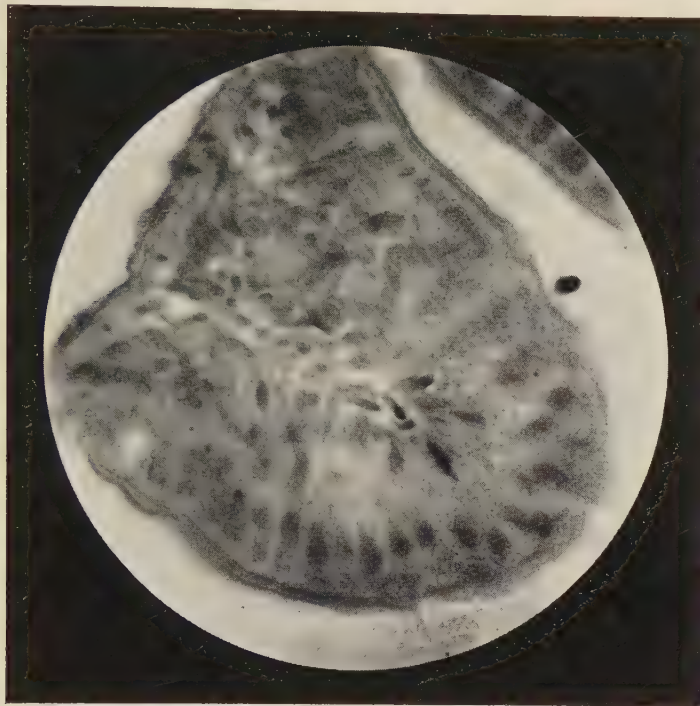


Abb. 3. Darmzotte von *Lebistes reticulatus* quer 8μ Mikrotomeinstellung, Färbung: Hämalaun-Eosin. Vergrößerung: ≈ 900 fach

Zusammenfassung

Synthawachs, ein jetzt im Handel erhältliches Polyäthylenglycol, eignet sich als Einbettungsmittel für Schnellmethoden. Es werden zwei Schnelleinbettungsmethoden beschrieben, die gegenüber den amerikanischen Methoden Verbesserungen aufweisen. Nach gewöhnlicher Fixierung können pflanzliche und tierische Gewebe damit unter Umgehung der Alkoholstufen verarbeitet werden. Die Methoden eignen sich daher auch für die Anfertigung von Autoradiographien. Die Brauchbarkeit wird durch drei Abbildungen von histologischen Schnitten dargestellt.

Schrifttum

1. APÁTHY, S. VON: ROMEIS, B., Mikroskopische Technik. 15. verb. Auflage, 1948, Leibniz-Verlag, München. — 2. BLANK, H.: A rapid imbedding technic for histologic sections employing a water soluble wax. J. invest. Derm. **12** (1949), 95—99 (Referat). — 3. BLANK, H., and MC. CARTHY, P. L.: A general method for preparing histologic sections with a water soluble wax. J. Lab. & Clin. Med. **36** (1950), 776—781 (Referat). — 4. BLANK, H., MC. CARTHY, P. L.,

De LAMANDER, E. D.: A non-vacuum freezing-dehydrating technic for histology, autoradiography and microbial cytology. *Stain Techn.* **26** (1951), 193—197. — 5. BOGOROCH, R.: Detection of radio-elements in histological slides by coating with stripping emulsion. *Stain Techn.* **26** (1951), 43—50. — 6. FIRMINGER, H. I.: Carbowax embedding for obtaining thin tissue sections and study of intracellular lipids. *Stain Techn.* **25** (1950), 121—123. — 7. HERINGA und Ten BERGE: siehe unter 1. ROMEIS, B. — 8. RUSSELL, R. S., SANDERS, F. K., BISHOP, O. N.: Preparation of radioautograph to show the distribution of P^{32} in plant tissues. *Nature* **163** (1949), 639—640. — 9. WADE, H. W.: Notes on the carbowax method of making tissue sections. *Stain Techn.* **27** (1952), 71—79.

[Eingegangen am 19. Juni 1952]

Geigyblau 536 med., ein neuer Vitalfarbstoff zum Nachweis der Blut-Gehirnschranke

Von **Helmut Leonhardt**

Unter den zur Prüfung und Darstellung der Blut-Gehirnschranke geeigneten sauren Farbstoffen steht seit GOLDMANN'S Untersuchungen das Trypanblau an erster Stelle. (Literatur über Trypanblau bei K. Fr. BAUER, V. MÖLLENDORFF SCHULEMANN, SPATZ.) Nach den Feststellungen von BROMAN, EICH und WIEMERS u. a. wie auch nach meinen eigenen Erfahrungen eignet sich jedoch Trypanblau nicht zum Nachweis feinerer Veränderungen an der Blut-Gehirnschranke; es ist ein grober Indikator. So läßt sich zum Beispiel eine in physiologischen Grenzen ablaufende Permeabilitätssteigerung während einer Gravidität mit Trypanblau nicht aufzeigen. Grobe, namentlich mechanische Schrankenläsionen können dagegen mit Trypanblau leicht dargestellt werden.

An anderer Stelle wies ich darauf hin, daß Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), von BECKER und QUADBECK zum Nachweis der Blut-Gehirnschrankenfunktion besonders empfohlen, unsichere Resultate ergibt. Allein bei schneller und technisch gesicherter Arbeitsweise lassen sich mit TTC solche Orte im Gehirn anfärben, deren Blut-Gehirnschranke vorher bereits geschädigt worden war; diese bricht unter der TTC-Einwirkung rascher zusammen, als die Schranke in anderen, nicht geschädigten Gehirngegenden. In diesem Sinne ist TTC ein feinerer Indikator für die Schrankenverhältnisse, als Trypanblau. Untersuchungen am Torpedo, an Kaninchen und Meerschweinchen zeigten aber, daß TTC zwar von der intakten Blut-Gehirnschranke zunächst zurückgehalten wird, diese aber innerhalb weniger Minuten zerstört und dadurch zu einer ausgedehnten Rotfärbung (Formazanbildung) im Gehirn führt. Das ursprüngliche „Schrankenbild“ wird also verwischt. Hinzu kommt, daß TTC nur dort zu Formazanbildung führt, wo ein genügend hohes Redoxpotential im Gewebe besteht. Gerade diese Vorbedingung aber kann bei pathologischer Schrankenschwäche nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden! Deshalb ist das Verfahren mit TTC zum Nachweis krankhafter Schrankendurchlässigkeit doppelt unsicher.

Zwischen diesen beiden Extremen, die durch Trypanblau und TTC charakterisiert werden, steht der von mir erstmalig zu Vitalfarbversuchen und zum Schrankennachweis verwandte Farbstoff Geigyblau 536 med.¹⁾. Er verhält sich nicht in derselben Weise indifferent, wie Trypanblau, vermag also Schranken, die in geringem Maße krankhaft geschwächt sind, zu durchbrechen. Eine normale Blut-Gehirnschranke dagegen schädigt er, im Gegensatz zu TTC, nicht. Überdies

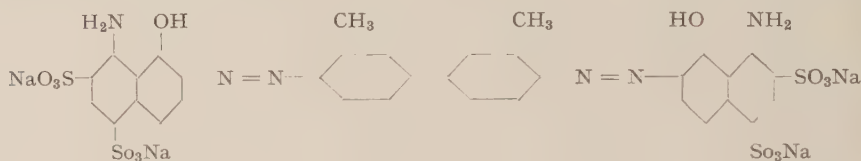
*) Herrn Professor MISLIN, Basel, verdanke ich die Bekanntschaft mit diesem Farbstoff.

ist Geigyblau kein Redoxindikator, die Blaufärbung des Gehirngewebes also nicht vom Redoxpotential des Ortes, sondern allein vom Zustand der Schranke abhängig. Eine Reihe weiterer Vorteile des Farbstoffes zeigen sich bei der mikroskopischen Untersuchung der mit ihm vital oder supravital behandelten Gewebe.

Im folgenden sind die mit Geigyblau bisher gemachten Erfahrungen zusammengestellt.

Geigyblau wird seit zehn Jahren zur Bestimmung der kreisenden Blutmenge beim Menschen angewandt. Seine Brauchbarkeit für diesen Zweck arbeiteten SOMOGYI, WIRZ und VERZAR aus. Nach den Untersuchungen von MEILI und den vorgenannten Autoren wirkt der Farbstoff selbst in großen Dosen nicht toxisch; bei Ratten, Hunden, Katzen und Kaninchen führte eine vielfache der zur Bestimmung der kreisenden Blutmenge benötigten Farbstoffmenge nicht zur Schädigung. Der Farbstoff soll sehr langsam ausgeschieden werden; nach 24 Stunden fand man noch 50%, nach 9 Tagen noch 20% der injizierten Farbstoffmenge im Blutserum. R. SCHUBERT berichtete, daß das Geigyblau durch Kollidongaben künstlich nierenfähig gemacht werden kann.

Der Farbstoff ist nach den Angaben des Laboratoriums Geigy Basel ein in Wasser kolloidal löslicher Tolidindisazofarbstoff mit schwach sauren Eigenschaften der nachstehenden Konstitution:



Er unterscheidet sich vom Trypanblau also durch die andere Stellung der zweiten Sulfosäuregruppe und wird im Blute, gleich dem Trypanblau, an das Serumalbumin gebunden. Sein Molekulargewicht beträgt 960,8.

Geigyblau verwandte ich bei Untersuchungen am Torpedo, am Kaninchen und Meerschweinchen, und zwar 1. in protrahierten subkutanen Gaben zum Zwecke der Vitalgranulabildung, 2. in großen Dosen, wenige Stunden nach deren Verabreichung das Versuchstier getötet wurde, zur Untersuchung von Schrankenverhältnissen unter Ausschluß vitaler reaktiver Veränderungen, und 3. zur supravitalen Durchspülung, ebenfalls im Rahmen von Untersuchungen über die Blut-Gehirnschranke.

Lösung: Der Farbstoff ist in 1%iger Lösung (auch in physiologischer Kochsalzlösung und Ringerlösung) frei von Niederschlägen. Das bedeutet gegenüber dem Trypanblau einen Vorteil, da dieses häufig zu Ausfällungen und damit im Versuch zu Farbstoffembolien führt (BROMAN, EICH und WIEMERS), wenn nicht sorgfältig filtriert wird. (SOMOGYI verwendet den Farbstoff Geigyblau in 1%iger Lösung zur Untersuchung am Menschen.) Konzentrationen von 1,5 bis 2% filtriert man auch hier zweckmäßigerweise. In 23 Vitalfarbversuchen bemerkte ich, daß gegen den Farbstoff eine individuell etwas unterschiedliche Empfindlichkeit besteht. Bei einigen Kaninchen, die aus einem Wurf stammten, führte eine Injektion von 12 ccm des 1%igen Farbstoffes in die Blutbahn nach etwa einer Stunde zum Tode, während ein anderes Geschwistertier 15 ccm des intravenös verabreichten Farbstoffes tagelang überlebte, ohne krankhafte Veränderungen

zu zeigen. Der Verdacht, es könne sich im Falle eines tödlichen Ausganges doch um multiple Embolien gehandelt haben, wird dadurch sehr eingeschränkt, daß ein anderes Tier, das auf 5 Tage verteilte subkutane Injektionen von insgesamt 3,5 ccm des 1%igen Farbstoffes, also eine relativ kleine Menge Farbstoff, erhielt, ebenfalls starb. Bei subkutaner Injektion sind aber Embolien so gut wie ausgeschlossen. Im allgemeinen vertragen Kaninchen im Alter von 3 Monaten 10 ccm der 2%igen Farbstofflösung in 0,9% Kochsalzlösung, intravenös verabreicht, reaktionslos. Diese Gaben betragen, bezogen auf das Körpergewicht, etwa das 500fache der zur Messung der kreisenden Blutmenge beim Menschen injizierten Farbstoffmenge.

Mikroskopische Sichtbarkeit: Der Farbstoff ist mit Objektiv 42 Okular 6 im Zustande der „Diffusen Gewebsdurchtränkung“, die die Zellkerne noch nicht anfärbt, im Unterschied zu Trypanblau noch sichtbar. Zur Klärung dieses Unterschiedes wurden Agarstückchen (3%iges Agargel) von der Größe $2 \times 3 \times 5$ mm entweder in Geigyblau oder in Trypanblau in den Konzentrationen 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% und 0,0001% gefärbt und ohne Fixierung bzw. nach unterschiedlicher Fixierung (Formol, Susa, Alkohol, Carnoy) über Alkohol oder über Dioxan in Paraffin eingebettet. Die 20μ dicken Schnitte zeigten unter dem Mikroskop, daß, abgesehen von der durch Susa bedingten Veränderung des Geigyblaus (s. weiter unten!) die beiden Farbstoffe keine sichere Differenz aufweisen. Beide Farbstoffe ließen sich gleichermaßen in jenen Agarstückchen, die ohne Fixierung über Dioxan eingebettet worden waren, mit Objektiv 10 Okular 7 noch in den Konzentrationen von 0,01% bei Beleuchtung durch weißen Schneehimmel wahrnehmen. Auch Baumwollfasern, in diesen Konzentrationen gefärbt, zeigten: Trypanblau und Geigyblau sind bei gleichen Konzentrationen und gleichen optischen Vergrößerungen mit gleicher Deutlichkeit sichtbar.

Die Beobachtung, daß bei stärkerer optischer Auflösung Geigyblau im Zustande der „diffusen Gewebsdurchtränkung“ im Gegensatz zum Trypanblau, noch sichtbar ist, kann demnach ihre Ursachen nicht allein im Farbstoff haben. Man muß den Grund hierfür in der Art und Weise suchen, in der sich das Geigyblau mit dem lebenden Protoplasma verbindet.

Die gefärbten Baumwollfädchen ließen bei Verwendung von Geigyblau und Einbettung in Caedax nach dreimonatigem Stehen im Lichte eine unveränderte makroskopisch sichtbare Blaufärbung bis zur Konzentration von 0,001% erkennen, während das Trypanblau nach derselben Belichtungszeit eben noch in einer Konzentration von 0,01% makroskopisch sichtbar war. Vital oder supravital mit Geigyblau gefärbtes Gewebe zeigte nach 9 Monaten noch eine unveränderte Färbung (Aufbewahrung im Licht).

Vitalgranulabildung: Die mikroskopische Untersuchung der Präparate ergab weiter, daß bereits 2 Stunden nach intravenöser Injektion der Farbstoff in den Makrophagen des lockeren Bindegewebes gefunden wird, die ihn nach dieser Zeit schon in Form von „Körnchen“ ablagern. Eine Stunde nach der Injektion von 10 ccm 1%iger Lösung in die Ohrvene sah ich beim Kaninchen in den Tubuli

contorti I der Niere eine außergewöhnlich intensive Blaufärbung. Diese war teilweise diffus, führte aber auch zur Bildung blauer Granula beiderseits des Kernes in der Gegend des Golgi-Apparates. Nicht selten werden auch kleine Vakuolen im Zytoplasma beobachtet. Da auch der Harn geringfügig blau verfärbt wird, kann wohl nicht daran gezweifelt werden, daß bei großen Farbstoffgaben auch die Nieren den Farbstoff ausscheiden. Bei toxischen Gaben entstehen starke Durchfälle mit Farbstoffausscheidungen durch den Darm.

Vielfach sieht man in jenen Versuchen, in denen nach kurzdauernder Farbstoffeinwirkung bereits Farbstoffkörner in Makrophagen der Gefäßadventitien auftreten, eine diffus blaue Verquellung der Gefäßendothelien und anderer Teile der Gefäßwand, so besonders in der Lunge und in der Neurohypophyse. Ähnlich verquillt bereits eine Stunde nach der Injektion großer Farbstoffmengen das Lymphknotenretikulum in vielen Stellen; Retikulumzellen vergrößern sich und bilden blaue Körnchen.

Daß der Farbstoff zur Darstellung der Schrankenverhältnisse im Gehirn vorzüglich geeignet ist, wurde oben erwähnt. Die betreffenden Untersuchungen veröffentlichte ich an anderer Stelle in anderem Zusammenhang.

Fixierung: Am besten läßt sich der Farbstoff mit dem Carnoygemisch fixieren. Er wird bei nachfolgender Entwässerung durch die Alkoholreihe nicht herausgespült und verliert nach dieser Fixierung selbst bei monatelangem Stehen im Lichte nichts von seiner Intensität. Ähnlich verhält er sich bei Alkoholfixierung, die nur ihrer bekannten Nachteile wegen hinter das Carnoygemisch zurücktritt. Die Fixierung mit Formol führt bei kurzdauernder Einwirkung in der Dunkelheit ebenfalls zu brauchbaren Resultaten, während sie bei Lichteinwirkung das Präparat stellenweise derart verändert, daß der blaue Farbstoff ein violettes bis bräunliches Aussehen erhält, ja sogar ganz ausblassen kann. Das Bouingemisch fixiert ebenfalls den Farbstoff ortsgerecht, verleiht ihm aber ein schmutziggrünes Aussehen. Dagegen wird der Geigyfarbstoff bei Anwendung von Sublimatgemischen (Susa, Formalin-Sublimat-Eisessig, Heldscher Fixierflüssigkeit mit Sublimat, Zenkersche Lösung) in kurzer Zeit am Lichte völlig zerstört.

Zur Vitalfarbmarkierung von Amphibieneiern in der Art der W. VOGTschen Methode wurde der Farbstoff bisher noch nicht benützt. Da er alkoholfest ist, scheint er hierfür jedoch gegenüber den Farbstoffen, die erst alkoholfest gemacht werden müssen (WINTREBERT: Bismarckbraun, Nilblau) im Vorteil zu sein.

Zusammenfassung

Der Farbstoff Geigyblau 536 med. ist ein feinerer Indikator zum Nachweis der Funktion der Blut-Gehirnschranke, als Trypanblau, ohne dabei die Nachteile des TTC zu besitzen. Seine Lösung, mikroskopische Sichtbarkeit, Dosierung im akuten Tierversuch, Verträglichkeit, Vitalgranulabildung und histologische Fixierung wurden untersucht.

Schrifttum

- BAUER, K. FR.: Beitrag zur Frage der Makrophagengenesse im entzündeten Gewebe bei vitalgespeicherten Tieren. Z. Zellf. **9**, 155 (1929). — BECKER, H., u. G. QUADBECK: Vitalversuche am Zentralnervensystem mit Tryphenyltetrazoliumchlorid. Naturwiss. **37**, 565 (1950). — BROMAN, T.: The permeability of the cerebrospinal vessels in normal and pathological conditions. Copenhagen: Munksgaard 1949. — EICH, J., u. K. WIEMERS: Über die Permeabilität der Bluthirnschranke gegenüber Trypanblau, speziell im akuten Sauerstoffmangel. Deutsche Z. Nervenheilk. **164**, 537 (1950). — GOLDMANN, E.: Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Abh. preuß. Akad. Wiss., Kl. I (1913) S. 1. — LEONHARDT, H.: Intraplasmatischer Stofftransport und Blut-Gehirnschranke. Z. mikr. anat. Forschg. **58**, 449, (1952). — MEILI, E.: Diuretica und zirkulierende Plasmamenge. Diss. Zürich 1947. — MÖLLENDORFF, W. von: Methoden zu Studien über vitale Färbung an Tierzellen. In: Abderhaldens Hdb. d. Biol. Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 1. — SCHUBERT, R.: Neue Wege der Entgiftung durch Infusion niedermolekularer Kollidonfraktionen. Dtsch. med. Wschr. **73**, 551 (1948). — SCHULEMANN, W.: Beiträge zur Vitalfärbung. Arch. mikr. Anat. **79**, 223 (1912). — SOMOGYI, J. C., H. WIRZ u. F. VERZAR: Veränderung von Gesamtblut- und Plasmamenge im Hochgebirge. Helv. med. Acta **7**, Suppl. 6, 44 (1940/41). — SOMOGYI, J. C.: Blutmengenbestimmung am Menschen mit dem Farbstoff Geigy-Blau 536 med. Schweiz. med. Wschr. **71**, 225 (1941). — SPATZ, H.: Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. Arch. f. Psychiatr. **101**, 267 (1934). — WINTREBERT, P.: La conservation, dans la coupes à la paraffine, des marques vitales au prun Bismarck et au sulfate de bleu de Nil, faites sur les oeufs vivants d'amphibiens. C. r. Acad. Sci. Paris **194**, 1013 (1932).

[Eingegangen am 28. Juni 1952]

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel. Direktor: Prof. Dr. Dr. E. FREERKSEN.

Die fluoreszenzmikroskopische Methode für die Darstellung und den Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis*

Von **Hermann Kölbel**

Mit 2 Abbildungen

Die Überlegenheit der fluoreszenzmikroskopischen Methode für den Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis* gegenüber der im normalen Hellfeld nach ZIEHL-NEESEN-Färbung wird durch vielfache, in der Literatur veröffentlichte Untersuchungen bestätigt. Die Vorteile bestehen in einer wesentlichen Arbeitserleichterung beim Färben und Auswerten der Präparate mit erhöhter Ausbeute an positiven Befunden. Um die Leistungsfähigkeit dieser Methodik voll ausnützen zu können, ist eine sorgfältig aufeinander abgestimmte Kombination von Erregerlichtquelle, optischem System und speziellen Lichtfiltern notwendig.

Die Entwicklung und praktische Erprobung eines von der Fa. Ernst Leitz G.m.b.H., Wetzlar, hergestellten Mikroskopes „B X“¹⁾, das uns seit September 1951 zur Verfügung stand, führte zu einem Gerät, welches den hohen Anforderungen routinemäßiger wie auch wissenschaftlicher fluoroskopischer Untersuchungen voll genügt und damit eine seit langem empfundene Lücke schließt. Die Ausrüstung des Mikroskopes mit einer Kohlenbogenlampe ermöglicht außerdem seine Verwendung für die Mikroprojektion.

Durch Vermessung des Absorptions- und Emissionsspektrums der mit dem Fluorochrom Auramin gefärbten Tuberkelbakterien konnten exakte Unterlagen für die Wahl entsprechend geeigneter Lichtfilter gewonnen werden²⁾. Um die optimale Darstellung kleinster mikroskopischer Objekte zu erzielen, sind folgende Anforderungen an die Filter zu stellen:

1. Zur Fluoreszenzerregung muß im Absorptionsgebiet eingestrahlt werden; d. h. die Absorptionskurve des gefärbten Objektes muß sich mit der Durchlässigkeitskurve des Erregerlichtfilters überschneiden.
2. Das Okularsperrfilter soll möglichst für das gesamte emittierte Fluoreszenzlicht durchlässig sein.
3. Die Durchlässigkeitskurve des Okularsperrfilters darf sich nicht mit derjenigen des Erregerlichtfilters überdecken.
4. Das Okularsperrfilter selbst soll keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

Bei Nichtberücksichtigung der unter 3 und 4 angegebenen Bedingungen ist kein ausreichend dunkler Untergrund im mikroskopischen Bild erzielbar.

Durch die Verwendung des im Fluoreszenzmikroskop B X eingebauten Schott-Filter UG 5 ergibt sich ein Erregungsbereich von etwa 3000—4200 ÅE. Das im

¹⁾ LEITZ-Druckschrift Nr. 8364.

²⁾ Eine Mitteilung über die Meßergebnisse im einzelnen erfolgt an anderer Stelle.

Tubus befindliche Okularsperrfilter GP nach KÖLBEL ist bis etwa 5000 Å durchlässig und — im Gegensatz zu anderen Okularsperrfiltern mit ähnlichen spektralen Eigenschaften — fluoreszenzfrei.

Wegen der Absorption der früher gebräuchlichen Okularsperrfilter im Gebiet der Emission zeigten die mit Auramin gefärbten Tuberkelbakterien eine goldgelbe Fluoreszenzfarbe; mit der jetzt vorliegenden Filtereinrichtung erscheinen sie strahlend grün-gelb, da die gesamte Emissionsbande auramingefärbter Tuberkelbakterien ungeschwächt ins Okular gelangt. Der bisher mit anderen Okularsperrfiltern absorbierte Grün-Anteil der Emissionsbande ist nicht nur wegen des absoluten Verlustes an Fluoreszenzlicht von Bedeutung, sondern auch subjektiv deswegen, weil das physiologische Empfindlichkeitsmaximum des Auges ebenfalls im Grün liegt. Die Nachweisempfindlichkeit aller grün-fluoreszierender Objekte oder solcher, deren Emissionsspektrum bis ins Grün reicht, konnte auf diese Weise merklich gesteigert werden, ohne daß die Notwendigkeit bestünde, mit reinem UV-Licht (unter 4000 Å) zu erregen.

Quecksilberhöchstdrucklampen als Erregerlichtquelle haben gegenüber Kohlenbogenlampen einen höheren Anteil an kurzwelligerem UV. Zur vollen Ausnutzung dieses Anteiles für die Fluoreszenz-Erregung wäre eine vollständige Quarzoptik notwendig. Das ist ein unnötiger Aufwand, zumal die Erregung im Absorptionsgebiet des Objektes erfolgen muß (s. o.), welches beim auramingefärbten Mycobacterium nach unseren Messungen im langwelligen UV liegt.

Die Rotdurchlässigkeit des verwendeten Erregerlichtfilters UG 5 wird durch eine etwa 20%ige Kupfersulfatlösung beseitigt. Diese Lösung dient gleichzeitig als Wärmeschutzfilter und ist in jedem Falle zwischen Kollimator und Filtersatz zu bringen, da sonst das hitzeempfindliche UV-Filter zerspringen würde.

Voraussetzung für eine optimale Darstellung ist eine gute Justierung der Bogenlampe, welche möglichst mit Gleichstrom zu betreiben ist. Durch die in den Strahlengang eingeklappte Mattscheibe ist die Justierung bequem zu überprüfen. Die laufende Kontrolle der Kohlenstellung ist durch den seitlich schräg gestellten Spiegel möglich. Bei richtiger Polung hat der Lichtbogen in der Nähe der waagerechten Kohle (+) die größte Leuchtdichte; ihr Strahlungskrater soll nicht durch die senkrecht stehende Kohle (—) verdeckt werden. Die Justierung des Kondensors geschieht mit Hilfe des Objektives 10/025, welches man zweckmäßigerweise auch zum Aufsuchen der Objektebene verwendet.

Das normale Arbeitsobjektiv für übliche Ausstrichpräparate ohne Deckglas ist das Objektiv Fl. 42/0,85 (Okular 10× oder 12×). Für anspruchsvolle morphologisch-zytologische Untersuchungen benutzt man das Objektiv Fl. Oel 95/1,32 mit fluoreszenzfreiem Immersionsöl. Gutes Paraffinöl (Merck, Paraffinum Liquidum pro injectione) ist hierfür ausreichend. Die beiden letztgenannten Objektive sind mit einem Irisblenden-Zwischenstück ausgerüstet. Die Blende soll nur soweit geschlossen werden, bis der durch Überstrahlung und Streureflection erzeugte Lichthof eben verschwindet. Ein übertriebenes Schließen der Objektivblende wirkt sich durch Verminderung der Apertur und damit des Auflösungsvermögens ungünstig auf die Bildqualität aus.



Abb. 1. M. Tuberculosis, Typ Gallinaceus Granulierte Verzweigungsform
Maßstab: 8 000:1

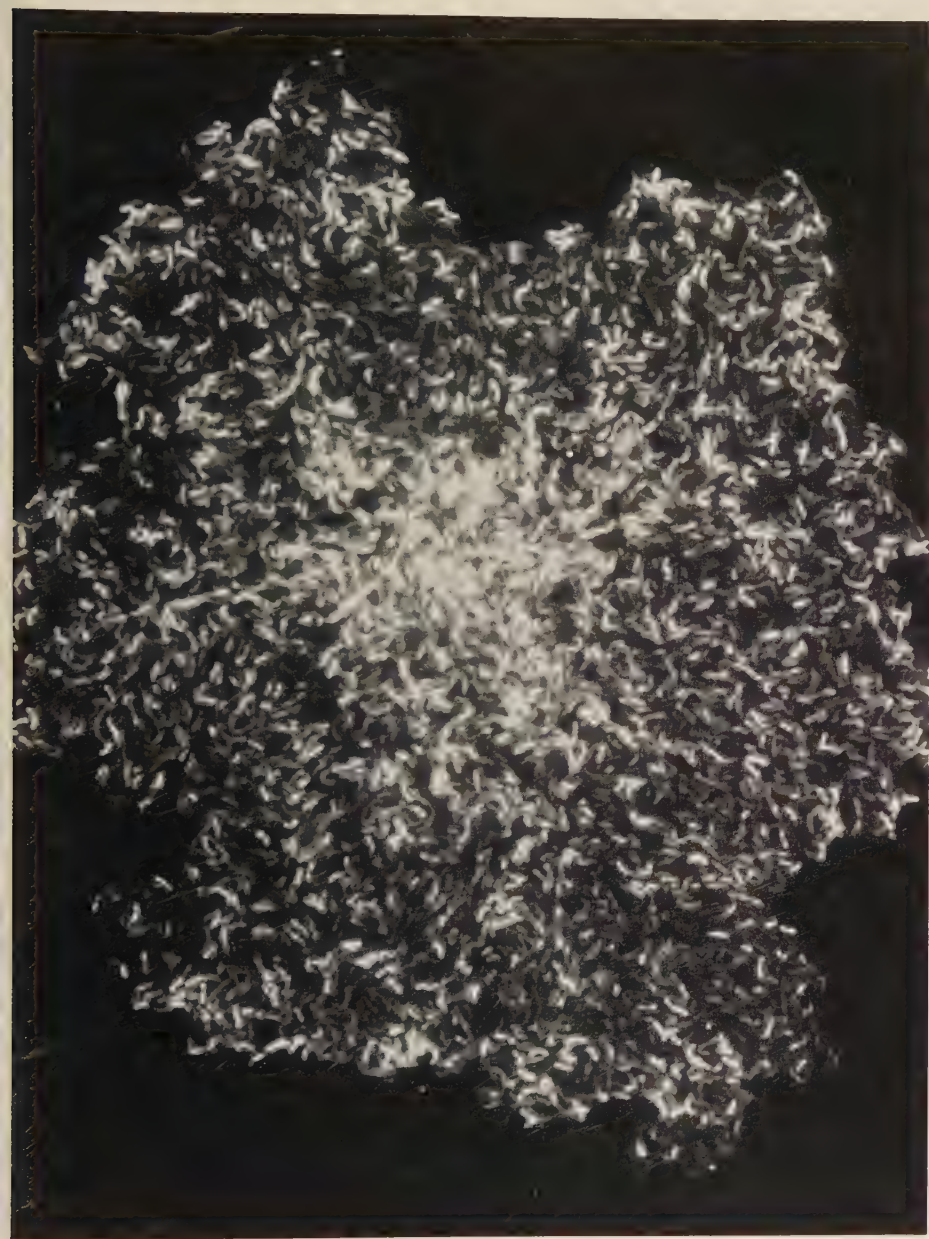


Abb. 2. M. Tuberculosis, Typ Gallinaceus Klon
Maßstab: 850:1

Die Anfertigung der Präparate geschieht in der üblichen Weise durch Austreichen des Untersuchungsmaterials in gleichmäßiger und nicht zu dicker Schicht. Eine vorherige Aufbereitung ist nicht erforderlich. Die üblichen Anreicherungsverfahren führen nicht immer zum Ziel. Bei einem spezifischen Gewicht des *Mycobacterium* von weniger als 1,03 ist der Sedimentationseffekt einer gewöhnlichen Laboratoriumszentrifuge gering. Deswegen empfiehlt sich häufig, das zentrifugierte Material in mehrere Fraktionen aufzuteilen und von jeder Fraktion ein Präparat anzufertigen. Nach dem Trocknen (in Sonderfällen evtl. im Vakuumexsikkator) folgt die Hitze-fixation. Die günstigste Temperatur hierfür beträgt 100 bis 120° C. Da bei der bisher üblichen Flammenfixierung Temperaturen in unkontrollierbarer Höhe erreicht werden und eine Überhitzung des Präparates sich ungünstig auf die Anfärbbarkeit der Bakterien auswirkt, erfolgt das Fixieren am besten auf einer Heizplatte, die mit einem Thermometer ausgerüstet ist. Die Präparate müssen staubfrei aufbewahrt werden.

Für die Färbung gibt es zahlreiche Modifikationen der zuerst von HAGEMANN angegebenen Fluorochromierung mit Auramin. Dieser Farbstoff ergibt die beste Darstellung. Folgende einfache Färbevorschrift wird empfohlen:

1. Färben mit Auramin (filtrierte Lösung 1:1000 in Wasser). Nach 3 Min. abgießen der Farblösung.
2. Differenzieren mit Salzsäure-Alkohol (4 ccm konz. HCl auf 1000 ccm Alkohol oder Brennspritus). Nach 1 Min. erneuern; nach 2 Min. abgießen. Abspülen mit dest. Wasser.
3. Gegenfärben mit Methylenblau (filtrierte Lösung 1:10000 in Wasser), nach 15—30 Sek. abgießen und nachspülen mit dest. Wasser.

Der gesamte Färbevorgang beansprucht etwa 5 bis 6 Min. Histologische Schnitte werden nach der Entparaffinierung in gleicher Weise behandelt. Zur weiteren Kontrastierung kann mit den verschiedensten Farbstoffen, Dia- wie Fluorochromen, nachgefärbt werden.

Der „klassische“ säurefeste Tuberkelbazillus, auf den sich der bakterioskopisch-diagnostische Nachweis gründet, ist ein schlankes, meist leicht gekrümmtes Stäbchen mit einer Dicke von 0,2 bis 0,4 μ und einer Länge von 2 bis 6 μ . Häufig ist die Lagerung charakteristisch (z. B. zwei Stäbchen in V-Form [Winkelbildung]) sowie das Auftreten einer Innendifferenzierung, die im ausgeprägten Stadium als Granulation bezeichnet wird (siehe Abb. 1). Diese Granula erscheinen als intensiv leuchtende Körperchen, über deren biologische Bedeutung („Sporid“, „Nucleoid“, „Karyoid“) keine einheitliche Auffassung herrscht. Sie können im Untersuchungsmaterial isoliert auftreten, sind aber hier wegen der Verwechslungsgefahr mit anderen unspezifischen Partikeln von annähernd gleicher Größe und Färbung nicht immer mit Sicherheit zu identifizieren. Besonders schwierig gestaltet sich eine solche Aussage bei so heterogenem Material wie Sputum, Stuhl und Magensaft; doch sollte auch hier das Auftreten dieser Partikel zu einer intensivierten Suche nach stäbchenförmigen Erregern Anlaß geben. Das gleiche gilt für die Tuberkelbakterien mit abgeschwächter Säurefestigkeit, wie sie in Abb. 2 neben säurefesten und teilweise granulierten Bakterien vielfach zu erkennen sind. Die

Darstellung solcher Stadien oder Erscheinungsformen ist wegen ihrer schwach grünlich leuchtenden Fluoreszenz überhaupt erst mit ausreichender Helligkeit im Fluoreszenzmikroskop B X möglich geworden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung histologischer Schnitte auf Tuberkelbakterien ist zu beachten, daß sich an den Gewebsrändern häufig Linseneffekte zeigen, die bei nicht ausreichender Erfahrung als an diesen Grenzen haftende Bakterien gedeutet werden können. In den meisten Fällen verschwindet aber ein so vorgetäushtes Stäbchen bei Untersuchung mit dem Immersionsobjektiv, welches in Zweifelsfällen immer herangezogen werden sollte. Ganz allgemein soll das hell leuchtende Stäbchen mit scharfen Konturen erscheinen.

Eine kritische Einstellung des Beobachters sichert einen fluoreszenzmikroskopisch positiven Befund in hohem Maße. Die beim Vergleich mit Kulturergebnissen trotzdem auftretende Diskrepanz erklärt sich daraus, daß es sich hier wie bei allen mikroskopischen Befunden lediglich um den Nachweis des Erregers als Objekt handelt. Die Kultur stellt dagegen einen biologischen Test dar, welcher die Vermehrungsfähigkeit mindestens eines lebenden Individuums zur Voraussetzung hat. Hieraus ergibt sich, daß der biologische Test eine notwendige und dementsprechend zu bewertende Ergänzung durch den mikroskopischen Nachweis finden muß. Wenn auf der anderen Seite die Kultur und insbesondere auch der Tierversuch positive Resultate liefert bei gleichzeitig mikroskopisch negativem Befund, so liegt das nur zum Teil daran, daß eine Verimpfung im allgemeinen mehr Material erfaßt als ein einfacher Ausstrich. Eine Erklärung ergibt sich vielmehr daraus, daß das *Mycobacterium tuberculosis* in nicht spezifisch deutbaren Formen auftreten kann. Eine gegenseitige Bestätigung der Befunde aller Nachweismethoden ist somit nicht immer zu erwarten.

Referate

Lapage, G., Parasitic animals. Cambridge 1951 (University Press). X und 351 Seiten. Preis geb. Sh 21.

Das gut ausgestattete Buch wendet sich nicht nur an Studenten, in deren Unterrichtsstoff die Parasitologie eine Rolle spielt, sondern an alle biologischen Interessenten, die sich über parasitische Tiere unterrichten wollen. Das geschieht nicht, wie so oft, in der Weise, daß nach einem allgemeinen Abschnitt die verschiedenen Gruppen in systematischer Reihenfolge behandelt werden, sondern so, daß in den 11 Kapiteln vorlesungsartig die allgemeinbiologischen Gesichtspunkte zur Sprache kommen. Z. B. geben zwei Kapitel repräsentative Lebensgeschichten von Parasiten, zwei andere behandeln die Einwirkung des parasitären Lebens auf den Parasiten, zwei weitere die Einwirkung der Parasiten auf den Wirt und so fort. Die 113 Figuren, teils Strichätzungen teils Autotypen auf Tafeln, machen den Leser mit zahlreichen Formen bekannt. Das Buch ist sehr zu empfehlen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Schmidt, W. J., Über das polarisationsoptische Verhalten des Augenpigmentes von *Sagitta setosa*. (Z. Naturforsch. 5b, 1950, 447—448 und 6b, 1951 466.)

Jedes Granulum des Augenpigmentes zeigt zwischen gekreuzten Nicols ein Polarisationskreuz bei blutrot erhellten Quadranten von positivem Vorzeichen. In Pyridin blassen die Granula langsam ab und verlieren das Polarisationskreuz. Es ist wahrscheinlich, daß das Pigment ein porphyrinartiger Körper ist.

W. J. Schmidt (Gießen)

Boehm, G., Über ein neues Verfahren zur Herstellung von Gußmodellen (Acta anatomica I, 450—462, 1946).

Das in Wachsplatten hergestellte Negativ des Modelles wird mit Portlandzement (100 g + 30 g Quarzsand + 50 ccm Wasser) ausgegossen, den man unter starker Vibration (mittels elektrisch schwingender Stahlplatte — Unterteil der elektrischen Kleinsäge AEG-Type ESI —) in kleinen frisch hergestellten Portionen einfließen läßt, was die Erfüllung verwickelter Hohlräume sehr erleichtert. Vorher wird in das Negativ ein versteifendes Skelet aus Eisendrahtstücken eingefügt, die schrittweise mit einer elektrischen Kleinschweißzange durch Punktschweißung vereinigt werden. Nach einer Woche wird der Gußkern behutsam mittels scharfen Skalpells freigelegt. Die Rekonstruktion wird für die Sammelröhrchen der Niere eines dreizehntägigen Mäuseembryos vorgeführt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Boehm, G., Über eine Doppelbrechung in Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis*. (Experientia 5 445, 1949.)

Die zopfartigen Stränge aus virulenten Tuberkelbakterien zeigen in Wasser beobachtet schwache zur Länge negative Doppelbrechung. Man könnte an Wirkung der von manchen angenommenen Wachs- oder Fetthülle denken, aber auch an optische Anisotropie einer verbindenden wohl aus Lipoid bestehenden oder solches enthaltenden Kittmasse. Zu erwägen bleibt auch, ob diese Doppelbrechung von positiver Formanisotropie überlagert wird, die durch die regelmäßige Anordnung der Bakterien nach Art eines Mischkörpers zustande kommt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Franke, H., Klinische Laboratoriumsmethoden. Unter Mitarbeit von G. Hilgetag. XV und 530 Seiten. Mit 8 Farbtafeln und 176 Abbildungen. Berlin 1952 (Walter de Gruyter & Co.). Preis geb. DM 34,50.

Das Buch gehört der Serie „Der Kliniker, ein Sammelwerk für Studierende und Ärzte“ an, herausgegeben von Professor Dr. J. ZADEK. Wenn auch in dem sehr ausgedehnten Gebiet der klinischen Laboratoriumsmethoden andere, chemische und physikalische Verfahren ausgedehnte Verwendung finden, so gibt es doch nur wenige Kapitel, in denen nicht das Mikroskop helfend oder beherrschend hervorträte: so bei Untersuchung der Harnsedimente, der Blutzellen, der Zytologie und Bakteriologie von Liquor, Punktatflüssigkeiten, Magen- und Darminhalt, Parasitologie, Sperma, Drüsen- und Organpunktionen, den Abstrichen von Mund, Nase, Rachen, Genitale und Wunden. All' dies wird nach der technischen und diagnostischen Seite, unterstützt von zahlreichen z. T. farbigen Bildern, kurz und klar so dargelegt, daß ein sicheres Arbeiten danach möglich ist. Zuvor wird das Mikroskop kurz in einem allgemeinen Abschnitt behandelt und die verschiedenen Sondermethoden wie Dunkelfeld, Polarisation, Phasenkontrast, Ultraviolett- und Fluoreszenz-Mikroskopie. Bei seinem mäßigen Preise wird das Buch gewiß bei Studierenden und Ärzten Beifall finden.

W. J. Schmidt (Gießen)

Boehm, G., Über eine rotfluoreszierende als Porphyrin anzusehende Substanz in den Augen von *Hirudo medicinalis*. (Experientia 3, 1947.)

Schneidet man das Vorderende eines narkotisierten Blutegels ohne Fixierung auf dem Gefriermikrotom an, so daß die Augen getroffen werden, dann zeigt der aufgefrorene Anschnitt unter einem darüber gebrachten Mikroskop bei schräger Beleuchtung mit konzentriertem Ultraviolettlicht intensive rote Fluoreszenz, wenn man nach scharfem Abkühlen das Präparat ein- oder mehrmals kurz an der Oberfläche auftauen und wieder gefrieren läßt. Der fluoreszierende Körper geht von der Pigmenthülle des Auges aus und diffundiert allseits in die Sehzellen und in geringerem Ausmaß auch in die Umgebung des Auges. Alkalien oder Säuren in geringer Konzentration vernichten die Fluoreszenz nicht. Im Mikrospektralokular zeigt sich ein Absorptionsstreifen in Rot etwa von etwa 605—627m μ . Es darf angenommen werden, daß der fluoreszierende Stoff Porphyrin ist; da dieses, wie bekannt, photodynamische Wirkungen auslöst, könnte man vermuten, daß die rotfluoreszierende Substanz etwas mit der Aufnahme der Lichtreize zu tun hat.

W. J. Schmidt (Gießen)

Bargmann, W., Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Zweiter Band, Organe und Systeme. XII und 563 Seiten. Mit 412 z. T. farbigen Abbildungen. Stuttgart 1951 (Georg Thieme). Preis Ganzleinen DM 45,—.

Der nach Papier, Druck, Abbildungen vorzüglich ausgestattete und preiswerte zweite Band (der erste, Zellen- und Gewebelehre, erschien 1948) ist im Sinne der funktionellen Histologie abgefaßt, begnügt sich nicht mit einer Beschreibung des mikroskopischen Baues der Organe, sondern stellt auch überall die Leistung heraus, insbesondere soweit sie morphologischer Betrachtung zugänglich ist. Das brachte es auch mit sich, daß neben Schnittbildern räumliche Synthesen der Ergebnisse mikroskopischer Forschung teils an eigenen, teils an fremden Abbildungen erläutert werden, deren Inhalt vornehmlich auf der Grenze der anatomischen und der histologischen Methode liegt — eine Grenze, die für biologische Betrachtung verschwindet. Weiter werden an geeigneter Stelle auch pathologische Befunde geschildert (s. z. B. Altersveränderungen des Gehirns). So trägt das Buch einerseits zu einer gegenseitigen Festigung des anatomischen und des histologischen Lehrstoffes bei und läßt andererseits bereits hier und da klinische Ziele anklingen.

Die gekennzeichnete Haltung prägt sich auch in der Stoffanordnung aus, indem z. B. im Abschnitte „Bewegungsapparat“ Skelet und Muskulatur zusammengefaßt werden oder Kreislauf- und Abwehrsystem (einschließlich des Thymus) vereinigt sind. Verschiedene Kapitel des Buches sind geschmückt mit guten Bildern von Forschern, denen das betreffende Gebiet besonders viel verdankt; vielleicht ist dies ein Weg, die Studierenden mehr an der Geschichte des Faches zu interessieren, als bisher zu erreichen war. Ein Verzeichnis der wichtigsten Literatur am Ende jedes Kapitels eröffnet dem Leser die Möglichkeit tieferen Eindringens. Die Abbildungen sind, soweit Originale, meist nach gezeichneten Vorlagen hergestellt; Mikrophotographien treten demgegenüber zurück. Der Umfang des dargebotenen Stoffes ist so gewählt, daß er im wesentlichen vom Lernenden beherrscht werden kann; auch das wird dem Buche unter den Studierenden Freunde erwerben.

W. J. Schmidt (Gießen)

Baer, J. G., Ecology of animal parasites. Urbana 1952 (The University of Illinois Press.). X und 224 S., 162 Abb. Preis gebunden 5 \$.

Das CH. JOYEUX gewidmete Buch behandelt im Gegensatz zu vielen anderen Werken über Parasitologie den Parasitismus als ein ökologisches Phänomen. Es gliedert sich in 5 Teile von sehr verschiedenem Umfang: Der erste gibt eine kurze Darstellung tierischer Assoziationen im allgemeinen; der zweite, weitaus umfangreichste behandelt die Anpassung des Parasiten an seine Lebensverhältnisse. Mit großen Geschick sind hier aus allen Gruppen in systematischer Folge geeignete Beispiele ausgewählt und mit vortrefflichen Abbildungen erläutert worden. Der dritte Teil betrifft die Beziehungen zwischen Wirt und Parasit, insbesondere die Wirtsspezifität und den Einfluß des Parasiten auf den Wirt. Der vierte gibt einen Abriß der Physiologie der Parasiten, unterteilt in Physiologie der parasitischen Protozoen (Blutparasiten, Darmsymbionten und -parasiten), Physiologie der parasitischen Würmer, in vitro-Kulturen parasitischer Würmer, und der fünfte schließlich behandelt den Ursprung des Parasitismus. Jedem größeren Abschnitt ist eine Zusammenstellung der wichtigsten vornehmlich neueren Literatur beigegeben, besonders wertvoll hinsichtlich des sehr bedeutungsvollen amerikanischen Schrifttums, das Verf. bei einem Aufenthalt in USA eingehend zu erfassen Gelegenheit hatte. Das Werk kann allen auf dem Gebiete der Parasitologie Interessierten auf das beste empfohlen werden; Studenten und Lehrer aller Kategorien werden aus den klaren und anziehenden Darstellungen reichen Nutzen schöpfen. Die Ausstattung des Buches nach Druck, Papier, Abbildungen, Einband ist vorzüglich.

W. J. Schmidt (Gießen)

Richards, A. G., The Integument of Arthropods. The chemical components and their properties, the anatomy and development, and the permeability. Minneapolis 1951 (University of Minnesota Press.). IX und 411 S., 65 Abb. Preis gebunden 6 \$.

Die Tatsachen und Einsichten betr. Chemie, Morphologie und Physiologie des Arthropodeninteguments sind so zahlreich und vielfältig und auch im Hinblick auf die angewandte Zoologie wichtig, daß es nahe lag, einige wichtige Kapitel in einer Monographie zusammenzufassen. Diese geht freilich nicht so in die Details, wie BIEDERMANNs einschlägige Darstellungen, deren Lektüre fast einem Lesen der Originalarbeiten gleichkommt. Vielmehr wird hier ein riesiges Schrifttum (Verf. zitiert im Anhang etwa 1800 Arbeiten, von denen einzelne sich allerdings auf andere zum Vergleich herangezogene Tiergruppen erstrecken) oft nur andeutend vermerkt, so daß der Leser für viele Einzelheiten auf die Originalarbeiten zurückgreifen muß. Aber anderes war bei dem gewählten Umfang des Buches auch wohl nicht möglich und der Autor hebt selbst die Schwierigkeiten mit dem

vorausgeschickten Motto hervor: „An author never finishes a book, he merely abandons it“. Wenn also das Buch, wie das schon der Untertitel andeutet, keineswegs alle mit dem Integument der Arthropoden zusammenhängenden Probleme behandelt, so eröffnet es doch den Zugang zu wichtigen Seiten des Gegenstandes: Der erste Hauptteil betrifft die chemische Zusammensetzung des Integumentes und bringt eine Übersicht betr. Chitin (darunter auch die interessante Frage nach der Zersetzung der Chitincuticulen in der Natur), Proteine, Pigmente, Lipide, anorganische Bestandteile (einschließlich Verkalkung) und physikalische Eigenschaften der Cuticula (so spez. Gewicht, Dehnbarkeit, Elastizität, Brechungsindex, Absorption, Fluoreszenz, Doppelbrechung, weitere Quellung, Benetzbarkeit). [Wenn bei der Doppelbrechung gesagt wird „neither cuticle . . . is pleochroitic“, so möchte Ref. darauf hinweisen, daß doch Fälle natürlichen Dichroismus bei Chitin bekannt sind: W. J. SCHMIDT, Z. wiss. Mikr. **54** (1937) 379—389]. Der zweite Hauptabschnitt ist der Mikroanatomie und der Entwicklung des Integumentes gewidmet; hier werden nach allgemeinen Abschnitten über die nichtchitinige Epicuticula und die chitinige Procuticula (welcher neue Terminus mit näherer Begründung eingeführt wird), die besonderen Differenzierungen, weitere Strukturfarben (leider vermißt man hier die nähere Betrachtung bestimmter Fälle), Epidermis, Önozyten, Blutzellen, Basalmembran, Häutung, Muskelansatz, Sehnen, Apophysen und dergl. mehr behandelt. Der dritte Hauptabschnitt ist der Permeabilität der Cuticula, ihrer Durchlässigkeit für Wasser, Gase, Elektrolyte, Nichtelektrolyte und Insecticide vorbehalten. Die Ausstattung des Buches ist gut; die Illustration erfolgte meist nach sauber durchgezeichneten Vorlagen in Strichätzung; aber auch Mikrophotogramme sind beigegeben, darunter eine Anzahl von elektronenoptischen, auf welchem Gebiete Verf. bemerkenswerte Beiträge erbracht hat.

W. J. Schmidt (Gießen)

Mitteilung aus der Abteilung für Elektronenoptik der Siemens & Halske AG.

Untersuchungen über regelbare magnetostatische Elektronenlinsen

Von E. Ruska*), Berlin

Mit 21 Abbildungen

- I. Ziel und grundsätzliches Ergebnis der Untersuchungen.
- II. Aufbau und Wirkungsweise der untersuchten regelbaren magnetostatischen Linsen-
anordnungen.
- III. Magnetmaterial und Magnetisierung.
- IV. Meßverfahren (Feldmessung mittels Fall- und Schwingspule, Vergrößerungsbestimmung
auf der elektronenoptischen Bank).
- V. Richtlinien für den Entwurf regelbarer magnetostatischer Linsensysteme.
- VI. Regelbare magnetostatische Linsensysteme für das Elektronenmikroskop.

I. Ziel und grundsätzliches Ergebnis der Untersuchungen

Unter den dreh-symmetrischen raumladungsfreien Elektronenlinsen zeichnen sich magnetische Linsenfelder vor elektrischen durch die Erzeugbarkeit besonders kleiner Brennweiten, sowie geringeren Öffnungsfehler, chromatischen Fehler und Astigmatismus aus. Zu dieser optischen Überlegenheit kommen betriebliche Vorteile, wie z. B. ihre bequemere Regelbarkeit und der geringere Aufwand zur Erzielung genügender Betriebszuverlässigkeit und nicht zuletzt der Vorteil ihrer besseren Verwendbarkeit für schnellere Elektronen. Der wesentlichste Nachteil der bisher meist verwendeten elektromagnetischen Elektronenlinsen besteht in dem Aufwand für eine geregelte Stromquelle, sei es eine Batterie oder ein geregeltes Netzanschlußgerät. Permanentmagnetische Elektronenlinsen wurden zunächst bei Kathodenstrahloszillographen verwendet¹⁾. Man hat aber auch bald versucht, die erforderlichen hohen Felder für Linsen kleiner Brennweite durch Permanentmagnete zu erzeugen, wie z. B. Siemens & Halske 1940 beim Aufbau eines magnetostatischen Durchstrahlungs-Elektronenmikroskops²⁾, mit dem bei 76 kV Strahlspannung eine 5200fache elektronenoptische Vergrößerung erreicht wurde. Abb. 1 zeigt diese aus einem außen liegenden, achsial magnetisierten Zylindermantel mit anschließenden Polstücken bestehende Linsen-anordnung³⁾ im Schnitt, und man erkennt daraus, daß diese Linse mit einem starken äußeren Streufeld behaftet ist. Das Elektronenmikroskop stellt besonders hohe Ansprüche an die Rundheit der

*) Vorgetragen am 6. November 1951 anlässlich der 50-Jahrfeier des National Bureau of Standards in Washington.

¹⁾ Z. B. H. RUMPF, Kathodenstrahloszillographen, Druckschrift 321 der Firma Dr.-Ing. HANS RUMPF, Bonn 1932, 20 S., auf S. 14/15 und S. 16.

²⁾ B. v. BORRIES, E. RUSKA, J. KRUMM u. H. O. MÜLLER, Übermikroskopische Abbildung mittels magnetostatischer Linsen, Natw. 28 (1940) S. 350—351.

³⁾ Vgl. a. W. SCHRÖDER DRP. 720927 vom 25. Februar 1937 und B. v. BORRIES u. E. RUSKA, DRPa. vom 7. März 1938.

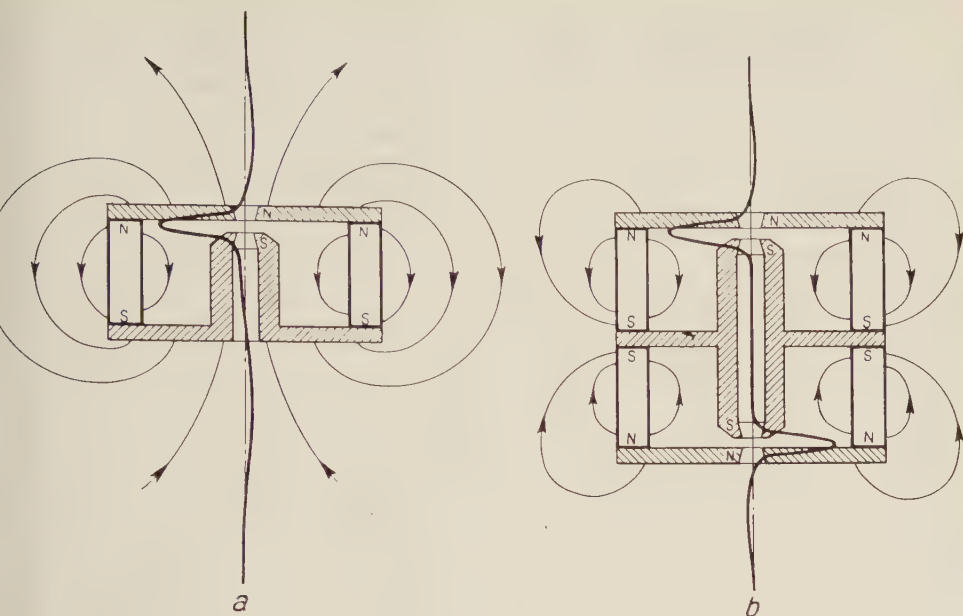


Abb. 1. Permanentmagnetische Elektronenlinsen mit äußerem Streufeld
a) einfache, b) zwei entgegengesetzte Achsialmagnete

Linienfelder und an die Ausrichtung der Linsen untereinander. Bei Linsenanordnungen mit äußerem Streufeld sind Störungen des idealen Linienfelds zu erwarten, wenn Eisenteile in das Streufeld gebracht und darin bewegt werden. Solche Linsen sind daher für das Elektronenmikroskop nicht besonders geeignet. Es wurde auch versucht, das achsial magnetisierte Rohr in das Innere der Linsenanordnung zu verlegen⁴⁾ (Abb. 2). Bei dieser Anordnung entsteht hinter dem Linienfeld am Polschuhspalt ein zweites ausgedehntes Feld im Innern des Rohrmagneten, das einerseits die kleinste erreichbare Brennweite in unerwünschter Weise vergrößert, andererseits infolge der ungenügenden Homogenität und der schlechten Bearbeitbarkeit des Magnetmaterials nicht genügend dreh-

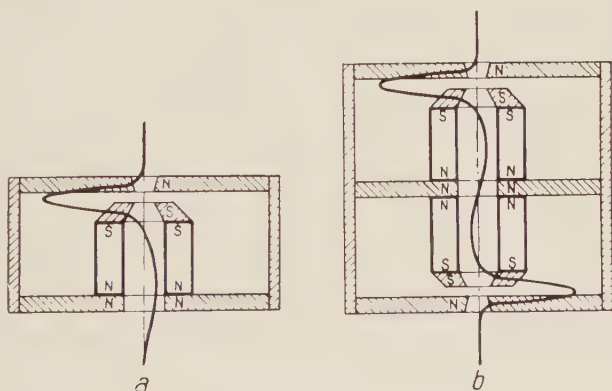


Abb. 2. Permanentmagnetische Elektronenlinsen mit innerem Streufeld.
a) einfache, b) zwei entgegengesetzte Achsialmagnete

⁴⁾ KÜPFMÜLLER und B. v. BORRIES, DRPa. vom 15. Januar 1943.

symmetrisch ist. Einige Vorschläge vermeiden beide Nachteile und führten zu streufeldfreien zweilinsigen Systemen. Hierbei befinden sich ein radial magnetisierter Ring⁵⁾ oder ein achsial magnetisiertes Rohr bzw. zwei solche Magnete gegenseitig aneinandergereiht⁶⁾ in einer Weicheisenkapselung mit zwei Ringspalten, an denen je ein Linsenfeld entsteht. Elektronenmikroskope mit achsial magnetisierten Linsensystemen wurden in neuerer Zeit durch v. BORRIES⁷⁾ und von REISNER und DORNFELD⁸⁾ verwirklicht. Bei der letzteren Anordnung sind die magnetostatischen Linsenfelder von etwa 1000 AW nicht variabel. Die Fokussierung erfolgt durch Änderung der Elektronengeschwindigkeit. Bei dem zuerst genannten Mikroskop wurden Linsenfelder von 2000 und 3200 AW erreicht, und es wird zur Änderung der Vergrößerung die Feldform in der Objektiv- und Projektivlinse variiert.

Für Elektronenmikroskope, aber auch für andere elektronenoptische Anordnungen, scheint uns aus betrieblichen Gründen die Regelbarkeit magnetostatischer Felder wesentlich zu sein. Eine Feldregelung innerhalb geringer Grenzen ist zur Scharfstellung bei konstanter Elektronengeschwindigkeit und gegebenem Objekt-Abstand erforderlich; innerhalb weiter Grenzen muß das Linsenfeld geregelt werden können, wenn unter Aufrechterhaltung der Brennweite die Elektronengeschwindigkeit stärker variiert werden soll, oder wenn bei gleichbleibender Elektronengeschwindigkeit die Vergrößerung des elektronenoptischen Systems stark geändert werden muß.

Wir stellten uns daher die Aufgabe, verschiedenartig aufgebaute, regelbare, magnetostatische Linsenanordnungen bezüglich der erzielbaren kleinsten Brennweite (größte erzielbare Feldstärke in der Linsenmitte $\dot{H}_{0 \max}$) und der Regelbarkeit zu größeren Brennweiten (kleinste erzielbare Feldstärke in der Linsenmitte $\dot{H}_{0 \min}$) zu untersuchen. Gleichzeitig sollten durch Ausführung verschiedenartiger Konstruktionen Erfahrungen über die zweckmäßigsten Methoden der Magnetisierung und die Ausführung der Regelorgane gesammelt werden. Die Untersuchungen wurden zusammen mit Herrn M. EISFELDT, Fräulein Dipl.-Phys. K. MÜLLER und Herrn Dr.-Ing. O. WOLFF durchgeführt und ergaben, daß die gestellten Anforderungen nach weitreichender stetiger Regelbarkeit der Felder bzw. Brennweiten durch verschiedene Anordnungen befriedigend erfüllt werden können. Die Aussichten für die Entwicklung von leistungsfähigen Elektronenmikroskopen mit regelbaren magnetostatischen Linsen scheinen uns daher günstig zu sein.

⁵⁾ B. v. BORRIES, DRPa. S 153 465 vom 24. Dezember 1942.

⁶⁾ E. G. RAMBERG, USA P 2 369 796 vom 26. März 1943; v. BORRIES, DRPa. vom 18. Oktober 1944.

⁷⁾ B. v. BORRIES, Die Übermikroskopie (SAENGER 1949, S. 104); Ein magnetostatisches Objektiv-Projektiv-System für das Elektronenmikroskop, Kolloid-Z. 114 (1949) S. 164—167; Ein magnetostatisches Elektronenschattenmikroskop als Elektronenbeugungsapparatur, Kolloid-Z. 118 (1950) S. 110—112; Ein magnetostatisches Gebrauchs-Elektronenmikroskop für 60 kV Strahlspannung, Z. wiss. Mikr. 60 (1951) S. 329—358.

⁸⁾ J. H. REISNER u. E. G. DORNFELD, A small electron microscope, J. Appl. Phys. 21 (1950) S. 1131—1139; J. H. REISNER, Permanent magnet lenses, J. Appl. Phys. 22 (1951) S. 561—565; J. H. REISNER, Permanent magnet electron microscope, Electronics 24 (1951) S. 86—91.

Aufbau und Wirkungsweise der untersuchten regelbaren magnetostatischen Linsenanordnungen

Die untersuchten Linsensysteme lassen sich alle aus zwei Grundformen ableiten, der radial magnetisierten Ringscheibe⁹⁾ und dem achsial magnetisierten Hohlzylinder¹⁰⁾. Selbstverständlich können beide Grundformen und ebenso Hohlzylinderformen durch Stabmagnete mehr oder weniger angenähert werden. Da bei den permanentmagnetischen Systemen das Integral der Feldstärke längs einer geschlossenen Bahn $= 0$ sein muß, ergibt sich die Verteilung der Feldstärke auf der Symmetrieachse z der beiden Magnettypen qualitativ nach Abb. 3a, 4a und 5a. Die noch relativ ausgedehnten, bezüglich der Feldrichtung einander entgegengesetzten Feldbereiche der symmetrischen Anordnungen von Abb. 3a und 4a sind untereinander gleich groß. Um Linsenfelder großer Brechkraft zu erhalten, müssen die Felder räumlich zusammengedrängt werden, so daß große Maximalfeldstärken \tilde{H}_0 auf der Achse entstehen. Man erreicht dies durch die Führung des inneren und äußeren magnetischen Streuflusses in einer Weicheisenkapselung geeigneter Form (Abb. 3b, 4b und 5b). Die beiden einander entgegengerichteten Feldbereiche auf der Achse werden an den beiden Polschuhsystemspalten unter Erhöhung der Maximalfeldstärke konzentriert, so daß zwei voneinander gut getrennte Linsen kurzer Brennweite entstehen. Für jedes nach außen streufeldfreie Permanentlinsensystem gilt für die Symmetrieachse

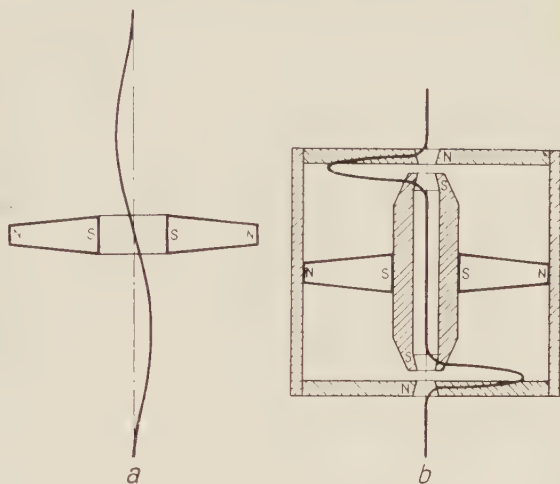


Abb. 3. Elektronenlinsenpaar, durch Radialmagnet erzeugt,
a) ohne, b) mit Weicheisenkapselung

es entstehen also auch bei dem gekapselten System (Abb. 4b), das auf die Grundform (Abb. 4a) mit nur einem achsialmagnetischen Hohlzylinder zurückgeht, auf der Achse zwei einander entgegengerichtete Feldbereiche gleichen Integrals. Alle nach außen streufeldfreien permanentmagnetischen Linsensysteme sind daher

$$\int_{-\infty}^{\infty} \tilde{H}(z) dz = 0.$$

es entstehen also auch bei dem gekapselten System (Abb. 4b), das auf die Grundform (Abb. 4a) mit nur einem achsialmagnetischen Hohlzylinder zurückgeht, auf der Achse zwei einander entgegengerichtete Feldbereiche gleichen Integrals. Alle nach außen streufeldfreien permanentmagnetischen Linsensysteme sind daher

⁹⁾ W. HENNEBERG, DRP. 689690 vom 2. September 1936.

¹⁰⁾ Vgl. Anm. 1.

auch frei von Bild Drehung, wenn man nur Strahlquerschnitte zu beiden Seiten des Linsensystems betrachtet. Da die Brechkraft einer magnetischen Linse mit dem quadratischen Feldstärkeintegral auf der Drehachse wächst, können wir durch verschiedene Dimensionierung der Polschuhsysteme (Polschuhdurchmesser und Spaltbreite bestimmen die Halbwertsbreite der Feldverteilung), die Brennweiten der Linsen verschieden groß machen, auch wenn für beide Linsfelder das $\int \mathfrak{H}^2(z) dz$

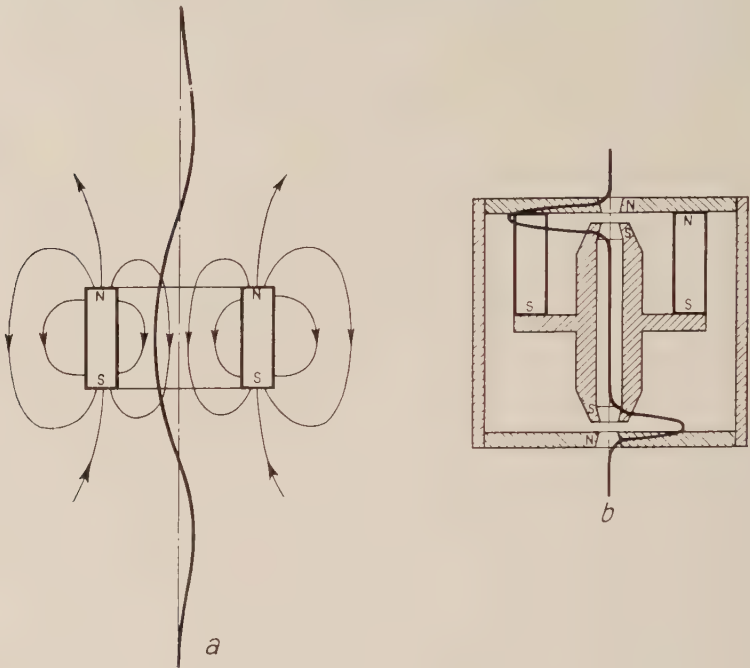


Abb. 4. Elektronenlinse bzw. Elektronenlinsenpaar, durch Achsialmagnet erzeugt, a) ohne, b) mit Weicheisenkapselung

denselben Wert hat. Permanentmagnetische Linsensysteme nach Art der Abb. 3b, 4b und 5b genügen daher bei solchen elektronenoptischen Anordnungen, bei denen in gegebenem achsialem Abstand zwei Linsen mit festen Brennweiten gefordert werden, die untereinander gleich groß oder voneinander verschieden sein können. Eine gleichlaufende Vergrößerung oder Verkleinerung beider Linsenbrennweiten läßt sich bei solchen Systemen mit unveränderlichen Magnetfeldern durch Erhöhung oder Erniedrigung der Elektronengeschwindigkeit erreichen.

Bei einigen wichtigen elektronenoptischen Geräten kann man aber auf eine Regelung der Linsfelder keinesfalls verzichten, zum Beispiel, wenn eine weitgehende Änderung der Elektronengeschwindigkeit aus irgendwelchen Gründen nicht zulässig ist, die Linsenbrechkraft beider Linsen aber dennoch gleichlaufend geändert werden soll, oder wenn eine voneinander unabhängige Brechkraftänderung zweier aufeinanderfolgenden Linsen erforderlich ist. So ist z. B. beim Elek-

Elektronenmikroskop die Elektronengeschwindigkeit mit Rücksicht auf die Schädigung des Objekts in gewissen Grenzen festgelegt. Die Brennweiten vom Objektiv und vom Projektiv des Elektronenmikroskops brauchen nur wenig oder gar nicht geregelt zu werden, während die Brennweiten der dazwischenliegenden Linsen zur Vergrößerungsänderung stärker geregelt werden müssen. Wir wollten daher streufeldfreie permanentmagnetische Doppellinsensysteme entwickeln, bei denen

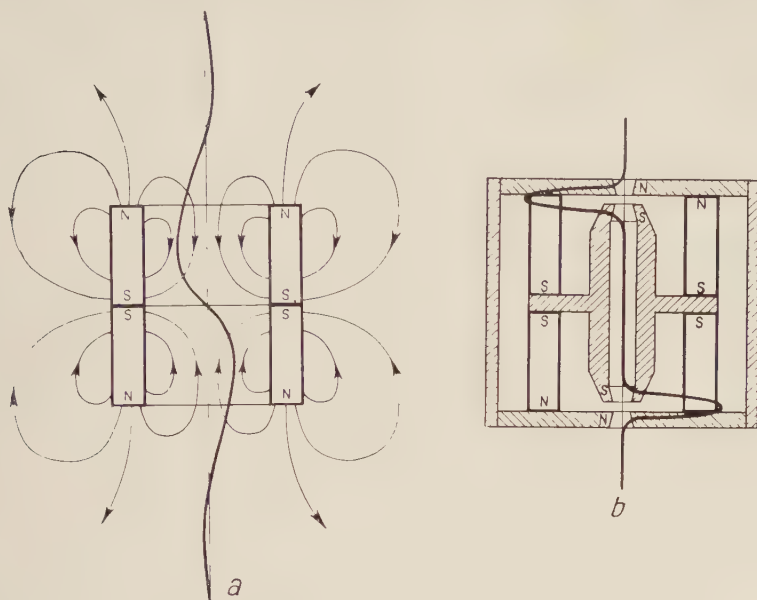


Abb. 5. Elektronenlinsenpaar, durch zwei entgegengesetzte achsiale Magnete erzeugt, a) ohne, b) mit Weicheisenkapselung

zumindest ein Linsenfeld in größerem Umfang mit möglichst kleiner Rückwirkung auf das zweite Linsenfeld regelbar sein sollte.

Um das Feld einer permanentmagnetischen Linse zu verringern, können wir vier verschiedene Wege einzeln oder gemeinsam beschreiten:

1. Schwächung der magnetomotorischen Kraft des Permanentmagneten durch Verringerung des Widerstandes des magnetischen Kreises. Dabei kann der Magnet auf seiner ganzen a oder auf einem variablen b Teil seiner Länge mehr oder weniger belastet werden. Die Koerzitivkraft verhindert jedoch eine stärkere Schwächung des Magneten, so daß auf diese Weise allein eine Regelung bis zur Ausschaltung der Linsenwirkung nicht möglich ist. Eine Veränderung der magnetomotorischen Kraft wirkt sich natürlich auf alle von dem Permanentmagneten erzeugten Linsenfelder in gleicher Richtung und annähernd gleicher Stärke aus.

2. Verbreiterung des Linsenfelds und Erniedrigung der maximalen Feldstärke \mathfrak{H}_0 bei konstanter magnetischer Spannung zwischen den Linsenspolschuhen durch Vergrößerung des Polschuhdurchmessers oder des Spalts zwischen den Polschuhen oder beider Abmessungen. Eine Regelung der Feldform kann entweder

durch Austausch verschiedener Polschuhsysteme oder durch kontinuierliche Änderung des Abstands zwischen den Polschuhen (Spaltbreite) erreicht werden. Auch durch diese Regelverfahren läßt sich die Brechkraft der Linsenordnung nicht völlig gleich Null machen.

3. Schwächung der magnetischen Spannung zwischen den Linsenpolschuhen bei konstanter magnetomotorischer Kraft des Permanentmagneten durch Ver-

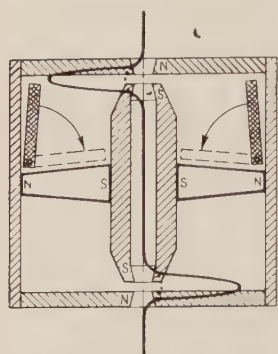


Abb. 6. Elektronenlinsenpaar mit Klappenregelung eines Radialmagneten

lagerung eines Teils der magnetischen Gesamtspannung vom Linsenspalt an andere Stellen des magnetischen Kreises (Spannungsteilerregelungen). Bei Anordnung eines magnetischen Regelspaltes in Reihe mit dem Linsenspalt kann das magnetische Regelfeld entweder überwiegend als äußeres Streufeld *a* oder überwiegend als zweites Linsenfeld *b* auftreten. Im letzteren Fall kann man die zweite Linse, falls ihre Brechkraft unerwünscht ist, durch geeignete Dimensionierung von Spalt und Polschuhdurchmesser schwach halten. In einigen Fällen ist das neu entstehende Linsenfeld jedoch auch erwünscht und kann durch Polschuhdimensionierung eine geeignete Größe erhalten. Bei einer Spannungsteilerregelung mit äußerem Streufeld läßt sich die Brechkraft beider Teillinsen praktisch ausschalten. Ihr kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Eine Spannungsteilerregelung läßt sich auch ohne Regelspalt durch Ausnutzung des immer auftretenden magnetischen Spannungsabfalls in den Weicheisenteilen *c* erzielen. Abhängig von der Dimensionierung des Weicheisenkreises und je nach der Art, wie die Verteilung der magnetischen Spannungen und die Abmessungen des Weicheisenkreises durch den Regelvorgang verändert werden,

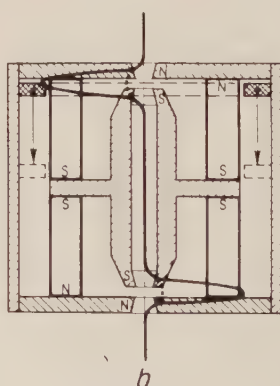
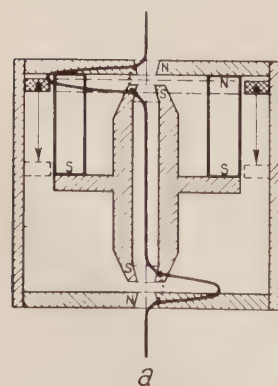


Abb. 7. Elektronenlinsenpaar mit Ringscheibenregelung außen,
a) einfache, b) zwei entgegengesetzte Achsialmagnete

kann man an verschiedenen Stellen der Achse des Magnetsystems Streufelder erzeugen, welche die Linsenfelder an den Spalten schwächen und selbst als schwache Nebenlinsen wirken.

Bei praktisch ausgeführten Regelmechanismen treten meistens mehrere der vorstehend aufgeführten Wirkungen gleichzeitig oder im Verlauf der Regelung hintereinander ein. Die in den Abb. 6—10

mit eingezeichnetem qualitativem Feldverlauf dargestellten Anordnungen haben wir bisher untersucht:

Radialmagnet mit Klappenregelung (Abb. 6). Die magnetomotorische Kraft des Magneten wird durch zusätzliche Belastung auf der ganzen Magnetlänge verringert.

Achsmagnete mit äußerer Ringscheibenregelung (Abb. 7). Die magnetomotorische Kraft des Magneten wird durch zusätzliche Belastung auf einem variablen Teil der Magnetlänge verringert.

Radial- oder Achsmagnet mit innerer Regelhülse (Abb. 8). Durch die Regelhülse wird bei zunächst nur wenig abnehmender magnetomotorischer Kraft des Magneten und der magnetischen

Spannung zwischen den Linsenspolschuhen die Maximalfeldstärke entsprechend geringfügig herabgemindert. Im letzten Teil des Regelwegs wird der Magnet durch die dann rascher wachsende Belastung schneller geschwächt, so daß die magnetische Spannung zwischen den Polschuhen entsprechend rascher abnimmt. Dadurch ergibt sich eine Abweichung von der meist erwünschten Proportionalität zwischen Regelweg und Brechkraft des Feldes. Je mehr die Regelhülse den Linsenspalt überbrückt, um so größer wird der Spannungsabfall im Weichen, so daß zu beiden Seiten des Linsenspaltess Streufelder auftreten durch die die Feldstärke im Spalt weiter vermindert wird.

Achsmagnet mit innerer Ringscheibenregelung (Abb. 9). Die Regelung erfolgt durch Teilstrecken-Nebenschluß des Magneten. Für den Spalt nimmt die magnetische Spannung ab. Die Restspannung tritt bei flacher Feldverteilung in dem übersättigten inneren Eisenrohr auf.

Radial- oder Achsmagnet mit Zackenrad-

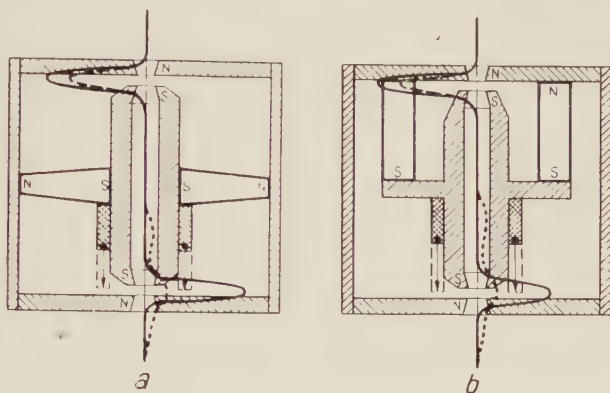


Abb. 8. Elektronenlinsenpaar mit Hülsenregelung,
a) Radialmagnet, b) Achsmagnete

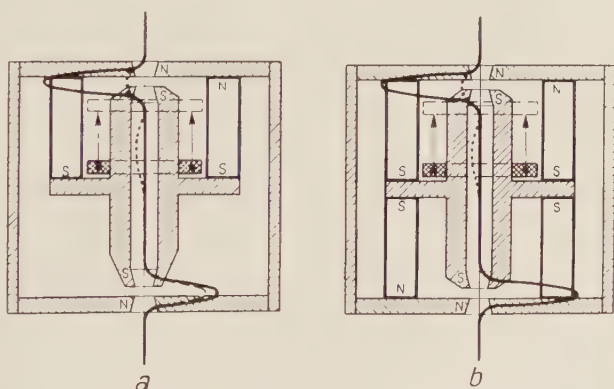


Abb. 9. Elektronenlinsenpaar mit Ringscheibenregelung
innen,
a) einfache, b) zwei entgegengesetzte Achsmagnete

Regelung (Abb. 10). Die Regelung erfolgt durch Aufteilung des magnetischen Spannungsabfalls auf einen Linsenspalt und eine äußere regelbare Luftstrecke. In der Ebene des Zackenrads entsteht je nach der Radstellung ein mehr oder weniger großes radial gerichtetes ringförmiges Streufeld, das dem Linsenfeld weniger großes radial gerichtetes ringförmiges Streufeld außerhalb der Weich-

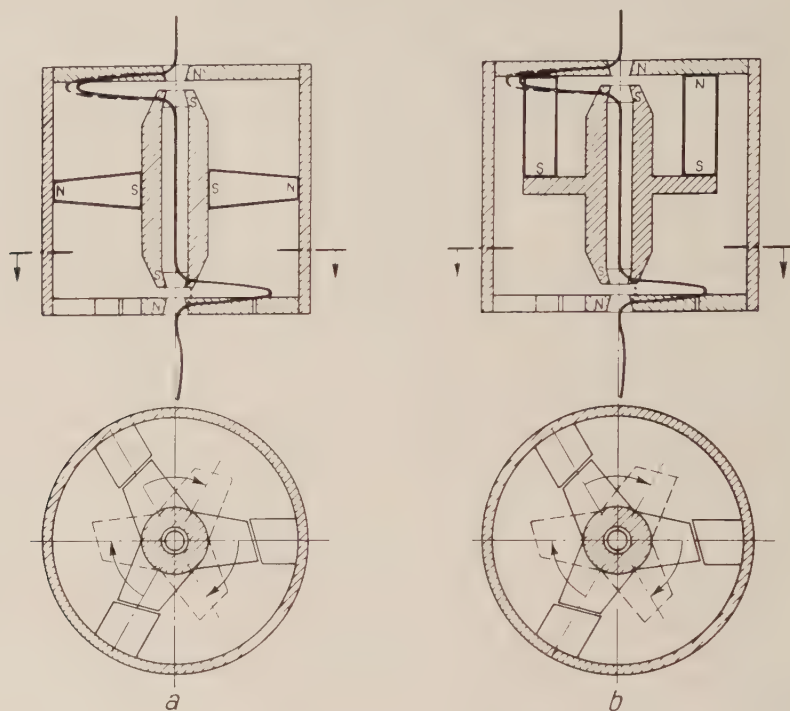


Abb. 10. Elektronenlinsenpaar mit Zackenradregelung
a) Radialmagnet, b) Achsialmagnete

eisenkapselung zur Folge hat. Wegen der großen Halbwertsbreite und des geringen Betrages des achsial gerichteten Streufelds hat dieses als Linse nur eine geringere Brechkraft.

Die in den untersuchten Anordnungen durch die Regelorgane erreichbare Herabsetzung der magnetischen Spannung an den Linsen bzw. der Maximalfeldstärke möge als Regelfaktor für die Feldstärke $R_{\Phi} = \frac{\Phi_{o \min}}{\Phi_{o \max}}$ bezeichnet werden.

Der Regelfaktor für die Brennweite $R_f = \frac{f_{\min}}{f_{\max}}$ folgt aus dem Regelfaktor R_{Φ}

in voneinander abweichender Weise, je nachdem ob bei der Regelung die Feldform (Halbwertsbreite) erhalten geblieben oder geändert worden ist. Bei gleichem Regelfaktor R_{Φ} ist bei unveränderlicher Feldform die Brennweite der Linse

stärker als bei Verbreiterung der Feldform regelbar, da im letzteren Fall das Feld über eine größere axiale Strecke wirksam ist, und die Brechkraft daher größer bleibt. Zur Bestimmung der absoluten Größe der Brennweiten müssen noch die Abmessungen der Polschuhsysteme berücksichtigt werden.

III. Magnetmaterial und Magnetisierung

Wir verwenden für die Permanentlinsen gegossenes Material vom Alnico-Typ mit Vorzugsrichtung, die einen $(B \cdot H)_{\max}$ -Wert von $4 \cdot 10^6$ cgs-Einheiten erreichen. Wir verwendeten für unsere Systeme 5...8 cm lange Magnete, zylindrische und konische Rohre für die Achsialsysteme, Formstücke für die Radialsysteme. Bei den ersten Versuchen wurden die Magnete vor dem Zusammenbau der Linsensysteme magnetisiert, wobei man natürlich keine volle Ausnutzung des Magneten erreicht. Wir gingen dann bald zu dem besseren Verfahren über, das zusammengebaute Linsensystem mit einem kräftigen Elektromagneten (30000 AW) zu magnetisieren. Achsiale Systeme mit nur einem Rohrmagneten lassen sich relativ einfach magnetisieren. Systeme mit zwei entgegengeschalteten achsialen Magneten trennten wir durch die Konstruktion so auf, daß die beiden Systemhälften einfach magnetisierbar waren. Größere Schwierigkeiten ergeben sich bei Radialmagnetsystemen, wenn man sie in zusammengebautem Zustand magnetisieren will. Wir halfen uns dadurch, daß wir ein sternförmiges System aus Stabmagneten aufbauten. Die Stabmagneten wurden erst allein, später mit einem Kurzschlußbügel magnetisiert, der erst nach dem Zusammenbau des geschlossenen Sternsystems entfernt wurde. Auch die Magnetisierung mit einer Ringspule (8000 AW), die koachsial zum Magnetstern neben diesem angeordnet war, wurde versucht, ergab aber keine genügende Wirkung.

IV. Meßverfahren

Man kann die Brennweite elektronenoptischer Linsen einerseits aus der Messung des Feldverlaufs auf der Achse, andererseits aus der bei einer Abbildung erzielten Vergrößerung bestimmen. Wir haben aus den nachstehenden Gründen beide Verfahren herangezogen. Einerseits konnten wir aus konstruktiven Gründen meist nur die zweistufige Vergrößerung eines magnetostatischen Linsenpaares bestimmen, so daß hieraus allein die Brennweite jeder einzelnen Linse, worauf es uns ankam, nicht genau festgestellt werden konnte. Andererseits wollten wir uns nicht auf die Ausmessungen der einzelnen Linsenfelder allein verlassen, da wir nur die Feldverteilung in der Nähe des Linsenspaltes, nicht aber die schwachen Restfelder zwischen den beiden Linsen mit unserer Meßeinrichtung erfassen konnten, die ebenfalls einen Einfluß auf die erreichbare Vergrößerung haben. Eine Abbildung zur Vergrößerungsbestimmung war uns überdies zur Beurteilung der Bildgüte erwünscht, da wir hofften, aus der Beobachtung des Astigmatismus auf die durch die Konstruktion oder die Herstellung bedingten Ursachen unrunder Linsenfelder Rückschlüsse ziehen zu können.

Feldmessung mittels Fall- und Schwingspule

Die Feldstärken auf der Linsenachse wurden in bekannter Weise durch ballistische Messung der vom Feld in kleinen Prüfspulen durch Induktion erzeugten Spannung bestimmt¹¹⁾. Während man zur Erzeugung der Induktion in der Prüfspule bei elektromagnetischen Linsen durch Umpolung des Stroms die Feld-

richtung umkehrt, wobei die Prüfspule ihre Lage im Feld beibehält und die doppelte dem Feld entsprechende Induktion auftritt, muß man bei der Ausmessung permanenter Magnetfelder die Prüfspule rasch von einer feldfreien Stelle in das zu messende Feld hereinbringen oder umgekehrt, wobei nur eine Induktion von der einfachen Größe des Feldes auftritt. Es wurde eine Meßeinrichtung geschaffen, bei der die Prüfspule ($n = 300$, $\varnothing = 1$ mm) um eine Strecke von 10 mm herabfallen kann, wobei sie genau in der Achse des auszumessenden magnetostatischen Linsensystems geführt wird. Später wurde auch eine in achsialer Richtung schwingende Prüfspule¹²⁾ verwendet, wobei die in der Spule entstehende Wechselspannung verstärkt wurde (Abb. 11). Man mißt hierbei nicht das Feld sondern den am Ort der Meßspule vorhande-

nen Feldgradienten $\mathfrak{H}' = \frac{d \mathfrak{H}_{(z)}}{dz}$.

Durch Verschiebung des Schwingungsmittelpunkts der Prüfspule

längs der Linsenachse kann man auch auf diese Weise sehr genaue Feldverteilungskurven erhalten, wie Abb. 12 und 13 zeigen. Aus dem gemessenen Feldverlauf läßt sich die Halbwertsbreite a^* der Feldverteilung und die maximale Feldstärke \mathfrak{H}_m^* entnehmen. Die gemessene Feldverteilung stimmt bekanntlich weit-



Abb. 11. Schwingspule zur Messung magnetischer Linsenfelder mit Modelllinse

¹¹⁾ J. DOSSE, Zur Ausmessung des Feldes magnetischer Elektronenlinsen, Z. Phys. 117 (1941) S. 437—443.

¹²⁾ O. WOLFF, Eine Schwingsonde zum Messen der Axialkomponente von Feldern magnetischer Elektronenlinsen, Phys. Verh. (1951) Nr. 4, S. 69 (3. Jahrestagung für Elektronenmikroskopie in Hamburg).

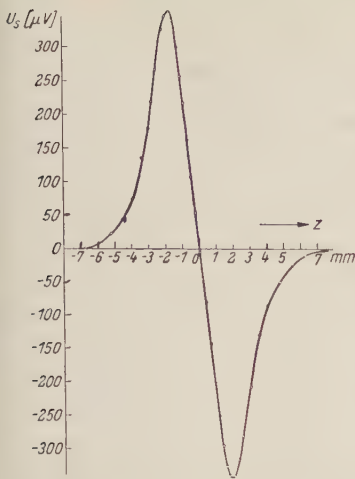


Abb. 12. Messung des Achsialgradienten des magnetostatischen Linsenfeldes mit Schwingsonde

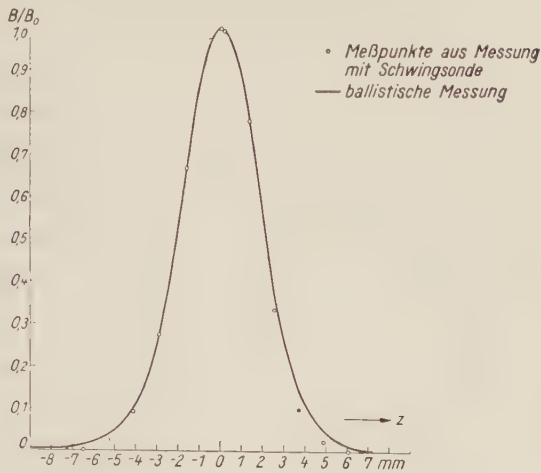


Abb. 13. Verlauf des magnetostatischen Linsenfeldes nach Messung mit Fall- und Schwingpule

gehend mit dem von GLASER¹³⁾ genauer behandelten Glockenkurvenfeld überein, dessen Brennweite mit

$$k^2 = \frac{e}{8 m U} (\mathfrak{H}_0 a)^2$$

$$\text{den Wert } \frac{f}{a} = \frac{1}{\sin \frac{\pi}{\sqrt{k^2 + 1}}} \text{ hat.}$$

Wir konnten uns vielfach die Ausmessung des ganzen Feldes ersparen und brauchten nur das Maximalfeld \mathfrak{H}_0^* allein zu bestimmen, da wir aus umfangreichen früheren Messungen an elektromagnetisch erregten Linsenpolschuhen verschiedenster Durchmesser und Spaltweiten den Zusammenhang zwischen Maximalfeldstärke und durch Vergrößerungsmessungen ermittelter Brennweite bereits kannten.

Vergrößerungsbestimmung auf der elektronenoptischen Bank

Zur Kontrolle der Brennweiten, die aus den ballistischen Messungen von \mathfrak{H}_0^* unter Berücksichtigung der aus den Polschuhabmessungen bestimmten Halbwertsbreiten errechnet wurden, haben wir die mit den magnetostatischen Linsensystemen erzielbaren elektronenoptischen Vergrößerungen gemessen. Diese Versuche wurden auf einer in den letzten Jahren von uns gebauten elektronenoptischen Bank¹⁴⁾ ausgeführt (Abb. 14). Diese Einrichtung wurde entwickelt, um rascher, als dies nach den bisherigen Gewohnheiten möglich gewesen wäre,

¹³⁾ W. GLASER, Strenge Berechnung magnetischer Linsen der Feldform $H = H_0[1 + (z/a)^2]$, Z. Phys. 117 (1941) S. 285—315.

¹⁴⁾ E. RUSKA, Über den Aufbau einer elektronenoptischen Bank für Versuche und Demonstrationen, Z. wiss. Mikr. 60 (1952) S. 317—328.

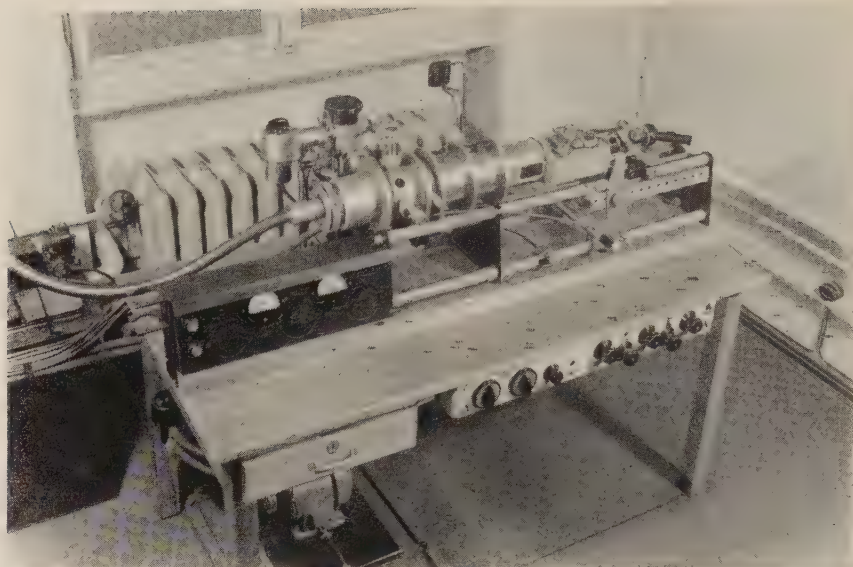


Abb. 14. Ansicht der elektronenoptischen Bank

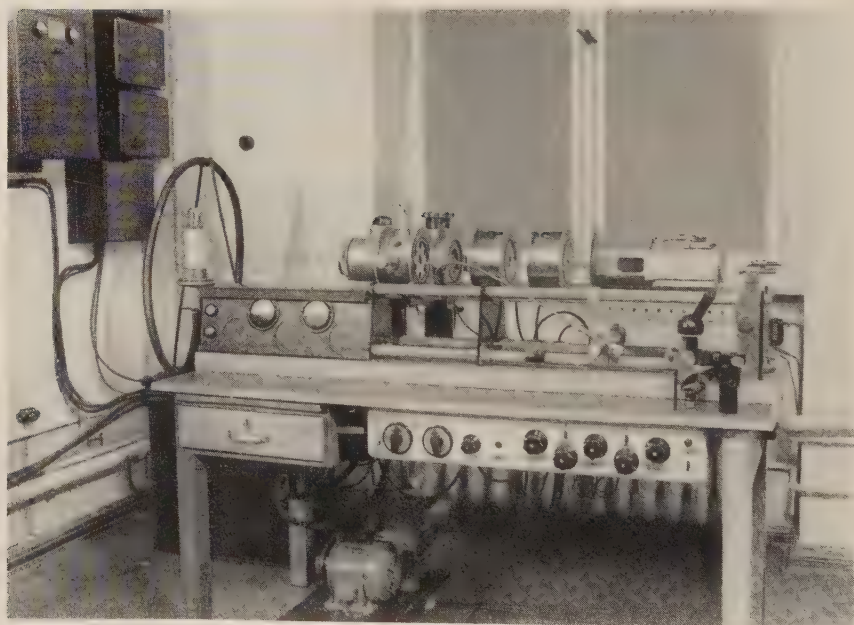


Abb. 15. Einzelteile der elektronenoptischen Bank

elektronenoptische Strahlengänge und Bauelemente zu untersuchen. Die Elemente einer elektronenoptischen Anordnung werden als getrennte Abschnitte eines Vakuumrohrs gebaut (Abb. 15). Elektronenstrahler, Objektbewegungseinrichtungen, Linsen verschiedener Arten und Brennweitenbereiche, Tuben zur Verlängerung oder Bildbeobachtung, sowie Einrichtungen zur unmittelbaren oder über den Leuchtschirm gehenden photographischen Aufnahme der Elektronenbilder einschließlich eines zur Beobachtung, Ausmessung und photographischen Aufnahme dienenden Mikroskops werden auf ein aus zwei parallelen Rohren bestehendes Bankbett eingelegt. Die Rohrabschnitte sind an beiden Enden mit gleich großen Kreisscheiben abgeschlossen, in die Gummiringe zur Vakuumdichtung eingelegt sind. Die Reihenfolge und der gegenseitige Abstand der elektronenoptischen Elemente kann daher innerhalb weniger Minuten variiert werden, wobei sich zwangsläufig eine hinreichende koachsiale Ausrichtung aller Einheiten des Vakuumrohrs ergibt. Der Strahl kann im Betrieb durch kreuztischartige Verschiebung der Kathode zum System Wehneltzylinder-Anode genau in die Bankachse gelenkt werden. Die Evakuierung erfolgt über ein einziges Ventil, das sämtliche Betriebszustände schaltet. Die Pumpzeit auf Betriebsvakuum beträgt etwa zwei Minuten. Die in Stufen einstellbare Hochspannung wird dem Elektronenstrahler und den elektrostatischen Linsen durch ein außen geerdetes Kabel berührungssicher zugeführt. Die Speisung elektromagnetischer Linsen, die je eine Grob- und eine Feinregelwicklung besitzen, erfolgt aus einer Batterie, wobei jeder Linse je ein Grob- und Feinregler zugeordnet werden kann.

Zur Bestimmung der Vergrößerung der magnetostatischen Systeme wurden von auf Glas geritzten Teilungen mit $\frac{1}{2} \mu$ Gitterabstand Abdruckfolien¹⁵⁾ gemacht und elektronenmikroskopisch abgebildet. Der Objektverschiebetisch konnte sowohl in Richtung der optischen Achse als auch kreuztischartig verschoben werden.

V. Richtlinien für den Entwurf regelbarer magnetostatischer Linsensysteme

Aus dem Vergleich der gemessenen Regelfaktoren für die Feldstärke R_δ der untersuchten Anordnungen ergeben sich einfache Richtlinien für den Bau regelbarer magnetostatischer Linsensysteme.

Da der äußere Streufluß eines magnetischen Hohlzylinders aus geometrischen Gründen wesentlich höher als der innere Streufluß ist, hängt der Fluß im Magneten im wesentlichen von Änderungen des äußeren Magnetflusses ab. So kann insbesondere eine wirksame Verringerung der magnetomotorischen Kraft des Magneten nur durch Erhöhen der Leitfähigkeit des äußeren Streuflusses erfolgen. (Klappenregelung, Abb. 6, oder Ringscheibenregelung außen, Abb. 7).

Soll die magnetomotorische Kraft des Magnetsystems bei der Regelung einer Linse möglichst wenig geändert werden, um z. B. die Brechkraft der anderen Linse unverändert zu lassen, so darf der Fluß durch den Magneten möglichst wenig geändert werden. Es dürfen daher keine Eingriffe in den äußeren Streukreis

¹⁵⁾ Wir danken Herrn Prof. H. KÖNIG (Darmstadt) für die Herstellung dieser Objektmikrometer.

erfolgen, und es müssen Eingriffe in den inneren Streukreis so ausgeführt werden, daß sich während der Regelung auch der innere Streufluß nur wenig ändert. (Spannungsteilerregelungen, Abb. 16 b.)

Die geringstmögliche Belastungsänderung des Magneten ist zugleich die Vorbedingung, mit einem Magnetsystem gegebener Abmessungen die größtmögliche magnetomotorische Kraft und damit Linsen höchster Brechkraft zu erzielen. Es lassen sich bei solchen Systemen leicht über 2000 *AW*, d. h. etwa 2500 GILBERT, zugleich bei minimalem Aufwand an Magnetmaterial (Gewicht) erzielen.

Die Brechkraft eines permanentmagnetischen Linsensystems läßt sich nur dann auf Null herunterregeln, wenn die beiden Linsen mit entgegengesetztem Feldbereich durch Vorschalten eines äußeren Regelspalts geschwächt werden (Abb. 16a).

Bei der Schwächung einer Linse eines streufeldfreien magnetostatischen Doppellinsensystems wird die zweite Linse geschwächt, wenn der Fluß im Magneten steigt, bzw. gestärkt, wenn der Fluß abnimmt. Eine Schwächung beider Linsen in etwa gleichem Umfang erfolgt bei der Klappenregelung (Abb. 6) und bei der Außenscheibenregelung (Abb. 7). Eine nur geringe Schwächung der nicht direkt herabgeregelten zweiten Linse erfolgt bei der Hülsenregelung (Abb. 8) und der Innenscheibenregelung (Abb. 9). Eine geringe Stärkung der nicht direkt herabgeregelten zweiten Linse erfolgt bei der Zackenradregelung (Abb. 10). Die Regelrückwirkung ist besonders gering, wenn bei Anordnungen mit Achsialmagneten die nicht direkt geregelte Linse einen eigenen Magneten hat. Falls daher die Regelung, wie bei der Innenscheibenregelung, innerhalb eines Magneten erfolgt, muß ein zweiter Magnet für die nicht direkt geregelte, möglichst unverändert zu haltende Linse aufgewendet werden. Eine Regelung kann auch, z. B. bei der Hülsen- und Zackenradregelung, außerhalb des Magnetzylinders erfolgen, so daß der eine Magnet ohnehin an der nicht geregelten Linse liegt.

Bei den Versuchskonstruktionen konnten einige nützliche Erfahrungen gemacht werden. Folgende Vorteile bestehen bei der Regelung elektromagnetischer Linsen:

1. Die Regelung ihrer Brechkraft erfolgt mit dem geringen Drehmoment eines elektrischen Drehwiderstands.
2. Bei Umkehr der Regelbewegung (z. B. bei der Scharfstellung) tritt nur ein geringer toter Gang auf.
3. Der Aufwand für die notwendige Grob- und Feinregelung ist gering.
4. Bei der Stromregelung ändert sich ferner nur die Feldstärke der Linse, ohne daß das Feld in seinen Symmetrieeigenschaften zur optischen Achse beeinflusst wird.

Um die gleichen Vorteile auch bei der Regelung magnetostatischer Linsen zu erhalten, sind einige Vorbedingungen zu erfüllen. Die Regelung durch Bewegung von flußführenden Eisenteilen erfordert um so weniger Kraft, je kleiner die zu bewegenden Teile sind, und je besser der Fluß in den Regelteilen senkrecht zur Bewegungsrichtung verläuft. Um so leichter kann auch die mechanische Anordnung von Totgang befreit werden, da keine einseitigen Kräfte auftreten. Das Gewicht des Regelgliedes ist bei Regelung durch eine innere Ringscheibe geringer als bei der Regelung durch eine äußere Ringscheibe. Die zusätzliche

Anordnung einer Feinregelung dürfte bei magnetostatischen Linsensystemen im allgemeinen einen höheren Aufwand als bei elektromagnetischen Systemen erfordern. Bewegt man zur Halbwertsbreitenregelung die Polschuhe desselben Linsensystems in achsialer Richtung gegeneinander, so wird das Linsenfeld infolge des unvermeidbaren radialen Spiels unsymmetrisch verzerrt, so daß beim Regeln leicht astigmatische Bilder und seitliche Bildverschiebungen auftreten, besonders wenn die geregelte Linse eine große Brechkraft, d. h. kleine Bohrung und kleinen Spalt aufweist.

Bekanntlich verlangen die Polschuhsysteme einen sehr hohen Grad von Drehsymmetrie, wenn in der Linse kein Astigmatismus auftreten soll. Da bei der Regelung magnetostatischer Linsen neben den eigentlichen Linsenfeldern häufig Streufelder geringer Brechkraft auf der Achse auftreten, muß man auch an diesen Stellen darauf achten, daß in den flußführenden Eisen teilen keine Abweichungen von der Drehsymmetrie auftreten. Läßt sich dieses aus konstruktiven Gründen nicht vermeiden, so sollte die Unsymmetrie mindestens zwei zueinander senkrechte Achsen aufweisen. Je breiter das optisch ausgenutzte Strahlbündel an der Stelle des Streufelds ist, um so genauer muß auf symmetrische Feldausbildung geachtet werden.

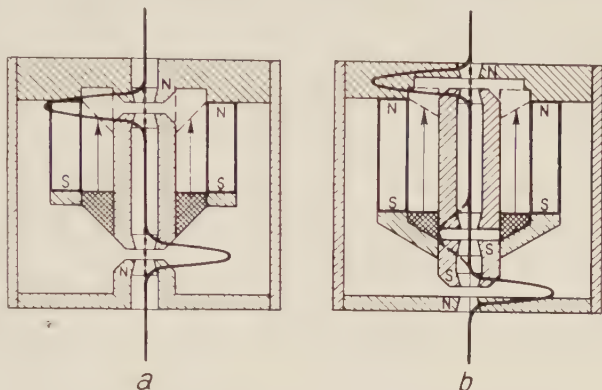


Abb. 16. Permanentmagnetische Zweilinsensysteme für weiten Regelumfang,
a) beide Linsen synchron geregelt, b) nur eine Linse geregelt

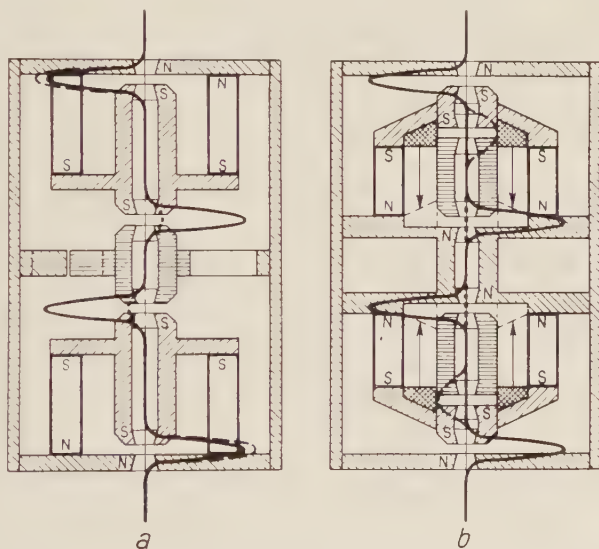


Abb. 17. Permanentmagnetische Mehrlinsensysteme für Elektronenmikroskope mit kontinuierlicher Vergrößerungsregelung,
a) Vierlinsensystem und Zackenradregelung beider Innenlinsen, b) Sechslinsensystem und Spannungsteilerregelung beider Innenlinsenpaare

VI. Regelbare magnetostatische Linsensysteme für das Elektronenmikroskop

Wir betrachten zunächst die Verhältnisse beim Beleuchtungssystem: Die Intensität der Objektbestrahlung wird meist durch einen Kondensor geregelt, dessen Brechkraft von einem sehr kleinen nur bis herauf zu einem mäßig hohen Wert gesteigert werden muß, welcher der Abbildung der Kathode auf dem Objekt entspricht. Es ist dabei vorteilhaft, wenn der Kondensor frei von Bild Drehung ist,

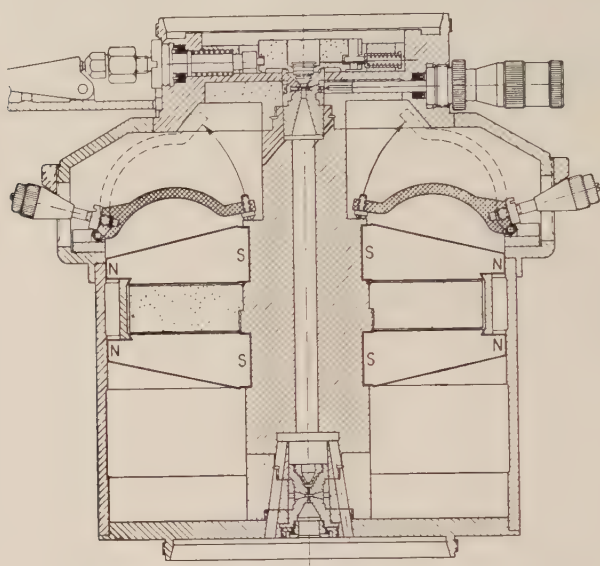


Abb. 18. Permanentmagnetisches Zweilinsensystem für Elektronenmikroskope fester Vergrößerung mit Klappenregelung zur Scharfstellung bei verschiedenen Elektronengeschwindigkeiten

um die Wanderung des Elektronenstrahls auf dem Objekt klein zu halten, die sonst bei einem nicht völlig koaxialen Eintritt des Elektronenstrahls in die Kondensorlinse besonders stark auftritt. Die relativ große Kondensorbrennweite läßt sich leicht durch eines der betrachteten bilddrehungsfreien Systeme aus zwei Einzellinsen verwirklichen. Die weitgehende Herabsetzung der Brechkraft kann z. B. durch eine Anordnung gemäß Abb. 16a erfolgen. Beim Verschieben der Regelhülse aus der Systemmitte nach außen wird das innere Weicheisenrohr sich in seinem magnetischen Potential immer mehr dem Systemgehäuse nähern.

Die Vergrößerungslinsen des Elektronenmikroskops, Objektiv, Zwischenlinsen und Projektiv, müssen alle mit einer hohen Brechkraft versehen werden können. Die Brechkraft braucht beim Objektiv und Projektiv nicht sehr variabel zu sein, falls die Elektronengeschwindigkeit unverändert bleibt. Bei den Zwischenlinsen, die dazu dienen sollen, die Vergrößerung kontinuierlich herabzusetzen, muß die Brechkraft jedoch auch bei unveränderter Elektronengeschwindigkeit stark

variabel sein. Da mit jeder Vergrößerungslinse eine kurze Brennweite erzielbar sein soll, können für alle diese Linsen im Gegensatz zu dem Kondensor, bei dem beide Spalte als Linsendublette wirken, nur Einzelfelder verwendet werden, die jedes ein reelles Bild erzeugen. Von den beiden Linsenseiten einer streufeldfreien Anordnung muß daher das eine stark, das andere braucht als Objektiv nur schwach, als Projektiv überhaupt nicht regelbar zu sein. Beide Regelungen müssen möglichst unabhängig voneinander sein (Zackenradregler, Abb. 10, oder Spannungsverteilung auf zwei Linsenseiten, Abb. 16 b). Zwei solche Doppelsysteme hintereinandergeschaltet ergeben eine vierstufig vergrößernde mikroskopische Anordnung, bei der die beiden innen liegenden und stärker regelbaren Zwischenlinsen eine weitgehende Variation der Vergrößerung erlauben. Am besten wurden diese Forderungen von Systemen nach Abb. 17a erfüllt, bei denen zwei gegeneinander geschaltete, außen liegende Achsialmagnete Objektiv und Projektiv unmittelbar erregen, und die Brechkraft der beiden inneren Linsen durch eine Zackenradregelung oder eine entsprechend wirkende Hülsenregelung heruntergeregelt wird. Bei beiden Regelungen ergibt sich der Vorteil, daß bei Herabregelung der beiden Innenlinsen die Brechkraft der Außenlinsen ansteigt, was für das Objektiv des Elektronenmikroskops erwünscht ist, da dann das Endbild bei der Vergrößerungsregelung besser scharf bleibt. Beim Projektiv braucht die Erhöhung der Brechkraft zumindest nicht störend zu sein. Eine etwas andere vierstufig vergrößernde regelbare mikroskopische Anordnung mit sechs Einzellinsen zeigt Abb. 17b. Hierbei liegen die entgegengesetzten beiden Achsialmagnete innen, und es ist zur Regelung der beiden Zwischenlinsen je eine Spannungsverteilung auf zwei Linsenseiten vorgesehen.

Die letzten Bilder zeigen Schnitte durch drei verschiedene magnetostatische Vergrößerungssysteme für Elektronenmikroskope, mit denen wir elektronenmikroskopische Bilder erzielten. Abb. 18 zeigt die technische Ausführung eines Zweilinsensystems mit Radialmagneten. Der Radialmagnet ist aus 8 Speichen zusammengesetzt. Jede Speiche besteht aus zwei Stabmagneten, die so geformt sind, daß in jedem Querschnitt annähernd die gleiche Induktion auftritt. Die Regelung der Linsenseiten erfolgt durch Klappen aus Weicheisen, welche die Magnetstäbe mehr oder weniger stark überbrücken. Die Klappen werden gemeinsam

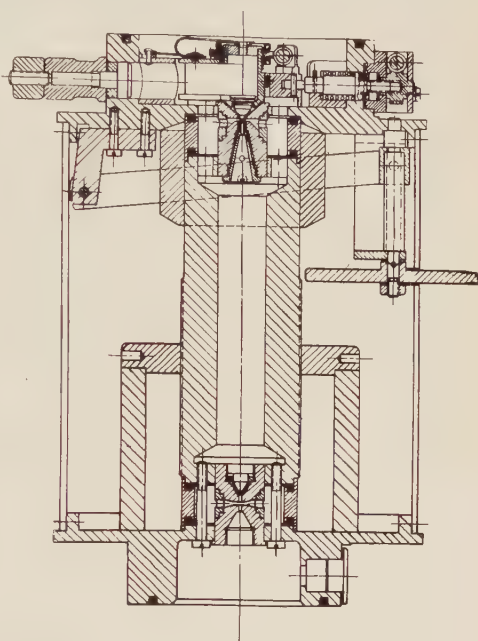


Abb. 19. Permanentmagnetisches Zweilinsensystem für Elektronenmikroskop veränderlicher Vergrößerung mit Hülsenregelung des Objektivs zur Scharfstellung und achsial verstellbarem Objektisch

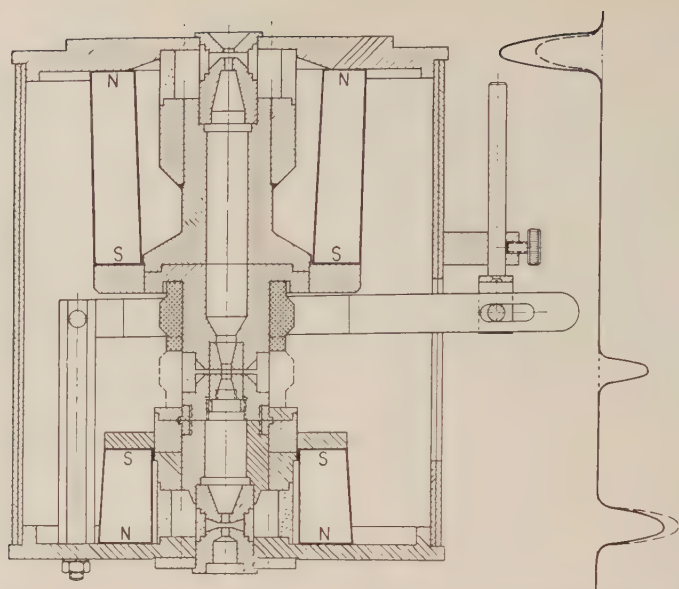


Abb. 20. Permanentmagnetisches Dreilinsensystem für Elektronenmikroskop veränderlicher Vergrößerung durch Hülssenregelung der Mittellinse

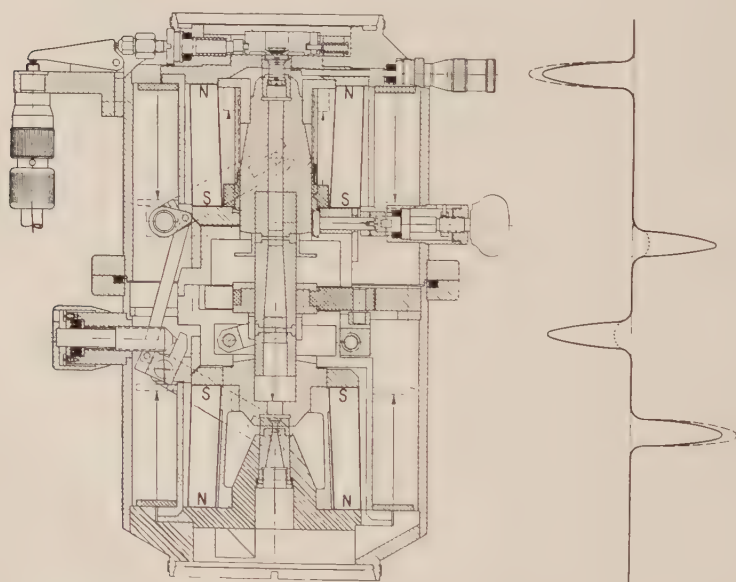


Abb. 21. Permanentmagnetisches Vierlinsensystem für Elektronenmikroskope veränderlicher Vergrößerung mit Innenscheiben-, Außenscheiben- und Zackenradregelung sowie Achsialverschiebung der Innenlinsenpolschuhe

geregelt, wobei jedoch eine Feineinstellung jeder einzelnen Klappe möglich ist. Abb. 19 zeigt ein zweilinsiges System, bei dem das Objektiv zur Scharfstellung mit einem Hülsenregler ausgerüstet ist. Eine begrenzte Vergrößerungsregelung erfolgt in der Objektivstufe durch achsiale Tischverschiebung. Abb. 20 zeigt eine Anordnung mit drei Linsen und zwei ungleich langen Achsialmagneten. Die Magnete sind so gegeneinander geschaltet, daß sich durch ihre Differenz eine Mittellinse bildet. Die Mittellinse wird durch eine Hülse heruntergeregelt, wobei sich als Rückwirkung eine Schwächung des Objektivs (langer Magnet) und eine Stärkung des Projektivs (kurzer Magnet) ergibt. Natürlich kann man die verschieden langen Magnete mit Vorteil auch umgekehrt anbringen.

Abschließend zeigt Abb. 21 eine von uns erprobte Vierlinsenanordnung entsprechend Abb. 17a mit Zackenregler für die beiden Mittellinsen zur Vergrößerungsvariation. Eine Anpassung aller Linsen an verschiedene Strahlspannungen erfolgt durch eine äußere Ringscheibenregelung und die Scharfstellung des Objektivs durch eine innere Ringscheibenregelung. Der Aufwand für eine solche Optik erscheint uns einstweilen noch recht beträchtlich, doch hoffen wir, durch bessere Konstruktion bald dem Ziel eines leistungsfähigen magnetostatischen Elektronenmikroskops näherzukommen.

[Eingegangen am 15. Oktober 1951]

Über die Farbabhängigkeit der Vergrößerung beim Elektronenmikroskop als störendem Fehler bei der Untersuchung dickerer Objekte

Von Werner Lippert

Mit 6 Abbildungen

Als wichtigste optische Eigenschaften eines Elektronenmikroskopes gelten im allgemeinen das Auflösungsvermögen und die damit zusammenhängenden Fehler. Die Spezialisierung auf bestimmte Probleme oder Objekte, wie z. B. Mikrotomschnitte kann jedoch dazu führen, daß andere Eigenschaften zur Erzielung optimaler Abbildungsverhältnisse in den Vordergrund treten. So verändert z. B. HILLIER¹⁾ für Mikrotomschnitte das Objektiv des RCA-Mikroskops, um stärkere Kontraste zu erzielen. Im folgenden soll auf eine andere Eigenschaft hingewiesen werden, die sich beim Arbeiten mit dickeren Objekten, bei denen also Elektronen mit Geschwindigkeitsverlusten in größerer Zahl vorhanden sind, besonders störend bemerkbar machen kann. Es handelt sich um die Abhängigkeit der Vergrößerung von der Elektronengeschwindigkeit.

Da die folgenden Überlegungen sowohl für magnetische als auch elektrostatische Linsen gelten und es also sinnvoll erscheint, beide Linsenarten von einem gemeinsamen Standpunkt aus zu betrachten, sollen zunächst einheitliche Bezeichnungen für beide verabredet werden: Bei starken Elektronenlinsen existieren nämlich bisher leider zwei grundsätzlich verschiedene Definitionen von Brennpunkt und Brennweite (Abb. 1), eine Tatsache, auf die auch W. GLASER²⁾ und O. BERGMANN³⁾ kürzlich in einer eingehenden theoretischen Arbeit hingewiesen haben.

Die eine (z. B. W. GLASER²⁾, E. RUSKA⁴⁾, B. v. BORRIES⁵⁾, F. LENZ⁶⁾) betrachtet den Schnittpunkt achsenparallel einfallender Strahlen mit der Achse als Brennpunkt (BF), den Schnittpunkt der Bahntangente des einfallenden Strahles im feldfreien Raum mit der Bahntangente im Brennpunkt als einen Punkt der Hauptebene (BH). Die zweite (z. B. H. BRUCK und L. ROMANI⁷⁾, O. RANG⁸⁾, F. HEISE und O. RANG⁹⁾) bezeichnet den Schnittpunkt der Bahntangente an den durch die Linse gegangenen, im feldfreien Raum verlaufenden Strahl mit der Achse als Brennpunkt (ΔF), und den mit der Tangente an den einfallenden Strahl im feld-

¹⁾ J. HILLIER, J. Appl. Phys. **22**, 135—137, 1951.

²⁾ W. GLASER und O. BERGMANN, ZAMP **1**, 363—379, 1950; **2**, 159—188, 1951. Herrn Prof. Dr. B. v. BORRIES und Herrn Dipl.-Phys. F. LENZ danke ich für den Hinweis auf diese Arbeiten.

³⁾ W. GLASER, ZS. Physik **117**, 285—315, 1941.

⁴⁾ E. RUSKA, Arch. Elektrotechnik **38**, 102—130, 1944.

⁵⁾ B. v. BORRIES, Die Übermikroskopie. Verlag Editio Cantor 1949.

⁶⁾ F. LENZ, ZS. angew. Physik **2**, 337—340, 1950.

⁷⁾ H. BRUCK und L. ROMANI, Cahiers de Physique, Oktober 1944, S. 15—28.

⁸⁾ O. RANG, Optik **4**, 251—257, 1948.

⁹⁾ F. HEISE und O. RANG, Optik **5**, 201—216, 1949.

freien Raum als Punkt der Hauptebene (AH). Die Größen der Definition 1 werden dann gebraucht, wenn der Gegenstand sich so tief in der Linse befindet, daß der Raum dort nicht mehr als feldfrei betrachtet werden kann (magnetisches Objektiv). Beim Projektiv beider Linsenarten dagegen interessieren die Größen der Definition 2. Beim elektrostatischen Objektiv liegt das Objekt im feldfreien Raum, hier liefern beide Definitionen identische Werte. Aus diesem Grunde erscheint es verständlich, daß die „Magnetiker“ die Definition 1 benutzt haben, (die für das magnetische Projektiv wichtige Brennweite der Definition 2 wurde zuerst von E. RUSKA (4) als „Vergrößerungsweite“ bezeichnet), während die „Elektrostatiker“ sich von vornherein für die Definition 2 entschieden haben. Zur Unterscheidung wollen wir im folgenden bei Definition 1 von Bahn- (B)-brennpunkt und Bahn- (B)-brennweite, bei Definition 2 im Anschluß an W. GLASER und O. BERGMANN von Asymptoten- (A)-brennpunkt und Asymptoten- (A)-brennweite reden.

Wenn auch bei „schwachen“ Linsen (Lage des Brennpunktes im feldfreien Raum) beide Definitionen dasselbe bezeichnen, beschreiben sie bei „starken“ Linsen die Abbildung grundsätzlich verschieden. Z. B. gibt es stets nur einen A -Brennpunkt, aber unter Umständen mehrere B -Brennpunkte. Dafür wird die A -Brennweite im Gegensatz zur B -Brennweite unter Umständen mehrere Male unendlich (mehrstufige Abbildung der elektrostatischen Linsen). Bei einer oberflächlichen Betrachtung von Arbeiten über magnetische und elektrostatische Linsen könnte es scheinen, als ob

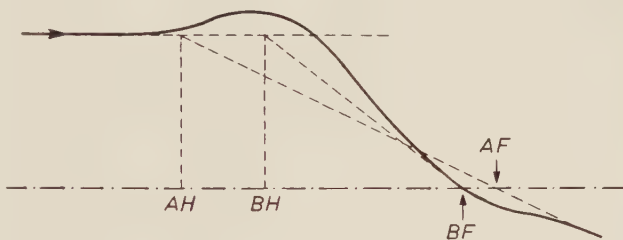


Abb. 1. Zur Definition von Brennpunkt und Brennweite bei starken Elektronenlinsen.
(Linsenachse strichpunktiert, Elektronenbahn stark ausgezogen)

für beide Linsenarten grundsätzlich verschiedene Abbildungsgesetze gelten, während im wesentlichen die Definitionen verschieden sind. (Der physikalische Vorgang ist selbstverständlich verschieden, für elektrostatische Linsen ist z. B. die starke Geschwindigkeitsänderung der Elektronen, für magnetische z. B. die Drehung der Bahnebene charakteristisch.) W. GLASER und O. BERGMANN haben gezeigt, daß die asymptotische Abbildung auch stets eine Newtonsche ist, d. h. aus der Kenntnis der Brennpunkte und -weiten lassen sich entsprechend den Verfahren der Lichthoptik alle für die Abbildung interessierenden Größen angeben. Die Asymptoten-Abbildung gibt zwar grundsätzlich nur eine Zuordnung der Bahnasymptoten auf der Objektiv- und Bildseite, ist aber für alle Asymptoten im Bereich des „achsennahen“ Verlaufs anwendbar. Dagegen sind Bahnbrennpunkt und Bahnbrennweite im allgemeinen Fall nicht ausreichend, um die Abbildung vollständig zu charakterisieren. Lediglich bei Beschränkung auf die Umgebung des (objektseitigen) Brennpunktes liefern die Formeln der Lichthoptik richtige Werte; nur dieser Bereich wird uns aber auch hier interessieren.

Über die Farbabhängigkeit der Vergrößerung läßt sich in erster Näherung folgendes sagen:

Im Bereich der GAUSSschen Dioptrik, also unter Vernachlässigung der Verzeichnung, gilt für die Gesamtvergrößerung V eines aus Objektivlinse O und Projektivlinse P bestehenden Systems:

$$V = V_O \cdot V_P = \frac{b_O - z_{OB}}{f_{OB}} \cdot \frac{b_P - z_{PA}}{f_{PA}}$$

Hier bedeuten b_O und b_P die von der Linsenmitte aus gezählten Bildweiten, z_{OB} und z_{PA} die Lage des Objektiv-*B*-Brennpunktes und die des Projektiv-*A*-Brennpunktes, f_{OB} die Objektiv-*B*-Brennweite und f_{PA} die Projektiv-*A*-Brennweite. Bezeichnet man mit v die Elektronengeschwindigkeit im einfallenden Strahl, so lautet die Bedingung dafür, daß die Farbabhängigkeit der Vergrößerung verschwindet:

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dv} = 0 = - \frac{1}{b_O - z_{OB}} \frac{dz_{OB}}{dv} - \frac{1}{f_{OB}} \frac{df_{OB}}{dv} - \frac{1}{b_P - z_{PA}} \frac{dz_{PA}}{dv} - \frac{1}{f_{PA}} \frac{df_{PA}}{dv}$$

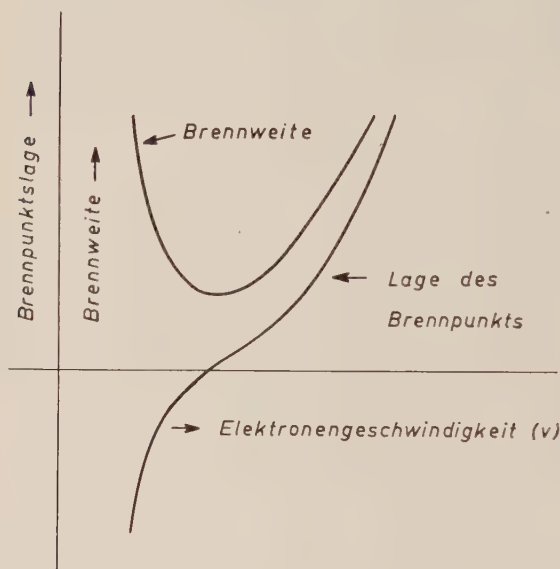


Abb. 2. Brennpunktslage und Brennweite als Funktion der Elektronengeschwindigkeit (schematisch)

Zur Diskussion der einzelnen Größen dieser Beziehung sei kurz an den Verlauf von f und z als Funktion von v erinnert. Für die *A*-Größen gilt im allgemeinen der Verlauf der Abb. 2. $f_A(v)$ durchläuft ein Minimum, d. h. $\frac{df_A}{dv}$ kann sein Vorzeichen wechseln, während $\frac{dz_A}{dv}$ konstantes Vorzeichen besitzt. Daraus ist zu schließen, daß $\frac{1}{f_{PA}} \cdot \frac{df_{PA}}{dv}$ durch Verlegung des Linsenarbeitspunktes so gewählt werden kann, daß die viergliedrige Summe verschwindet. (Im praktischen Fall sind bei starken Ver-

größerungen die Glieder $\frac{1}{b - z} \frac{dz}{dv}$ relativ klein.) Zur Vermeidung dieses Farbfehlers kann man also den vom Objektiv herrührenden Fehler durch „Überkorrektur“ des Projektivs kompensieren.

Mit der Verlagerung des Linsenarbeitspunktes im f, v -Diagramm ändern sich gleichzeitig auch andere Linsenfehler. Für die Vermeidung der Verzeichnung ist, wie O. RANG⁹⁾ gezeigt hat, ebenfalls die Lage in der Nähe des Brennweitenminimums wünschenswert. Während bei magnetischen Projektiven die Verlegung des Arbeitspunktes in die Nähe des Brennweitenminimums durch Änderung des Linsenstroms i. a. ohne weiteres möglich ist, und auch aus anderen Gründen (Größe des Gesichtsfeldes) wohl meistens vorgenommen wird, ist bei elektrostatischen Projektiven, falls die übliche Zweipunktschaltung benutzt wird, eine Verlegung des Arbeitspunktes nur durch Änderung der Geometrie der Elektroden durchführbar.

Im Gegensatz zu diesem Farbfehler der Vergrößerung, dessen Beseitigung streng in der zur Diskussion stehenden Näherung möglich ist, ist für die Kleinhaltung des üblicherweise mit „Farbfehler“ oder „chromatische Aberration“ bezeichneten Fehlers des Objektivs erforderlich, daß die Lage des Brennpunkts sich mit der Elektronengeschwindigkeit möglichst wenig ändert. Da die Brennpunktslage im Gegensatz zur Brennweite als Funktion der Elektronengeschwindigkeit keinen Extremwert besitzt, ist der Objektivfarbfehler nicht durch Änderung des Linsenarbeitspunktes zu beseitigen. (Vgl. W. GLASER¹⁰.)

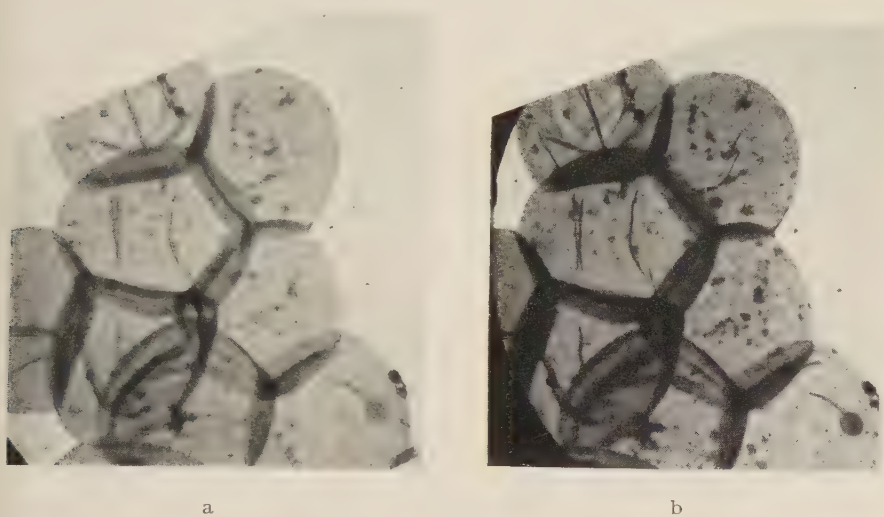
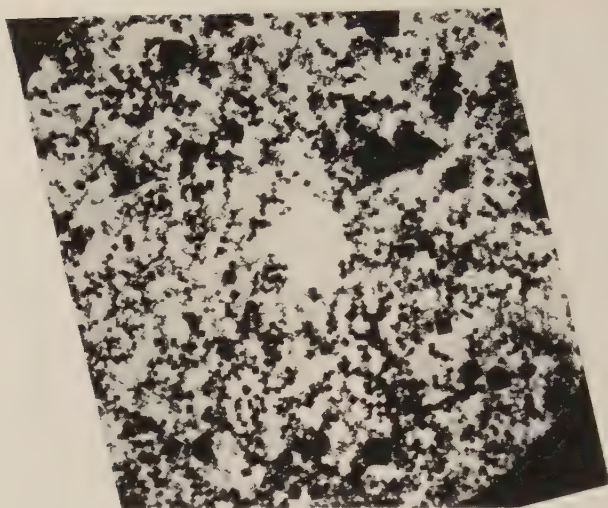


Abb. 3. Kontrastschwaches Erythrocytenpräparat auf dünner Folie.
Aufgenommen mit Anordnung I Aufgenommen mit Anordnung II

Zur Demonstration des Fehlers wurden Aufnahmen mit 2 verschiedenen elektronenoptischen Anordnungen gemacht, von denen die eine („I“) den Fehler praktisch nicht, die andere („II“) ihn stark zeigt. Benutzt wurde eine Spannung von 50 kV, die elektronenoptische Vergrößerung betrug in beiden Fällen ungefähr 4000.

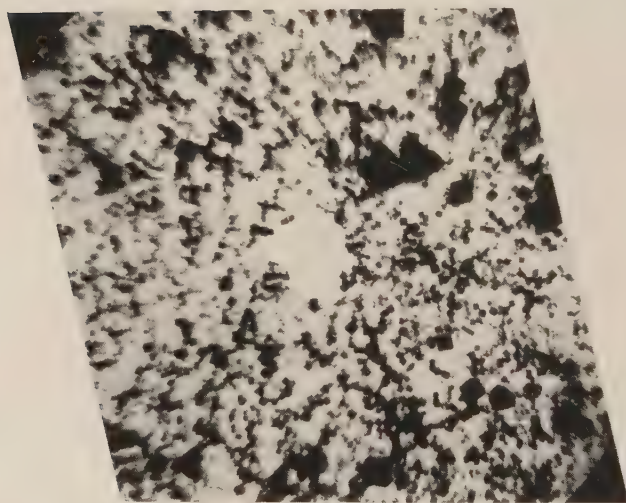
Zunächst wurde gezeigt, daß bei dünner Objektträgerfolie und dünneren Objekten (z. B. hämolysierte Erythrozyten) der Fehler nicht stört. (Abb. 3a und 3b.) Beide Bilder unterscheiden sich lediglich dadurch, daß „II“ eine relativ starke kissenförmige Verzeichnung zeigt. (Die Vergrößerung ist am Rande etwa 20% größer als in der Mitte.) Bei Objekten wie den vorliegenden fällt diese Verzeichnung praktisch nicht auf. Hat man aber z. B. sehr kontrastreiche Teilchen, z. B. MgO, auf dicker Trägerfolie (Abb. 4a und 4b), so tritt eine wesentliche Beeinträchtigung der Erkennbarkeit bei der Anordnung „II“ auf: Im optischen Zentrum sind beide abbildenden Systeme annähernd gleichwertig, außerhalb treten jedoch

¹⁰) W. GLASER, ZS. f. Physik **116**, 56, 1940.



a

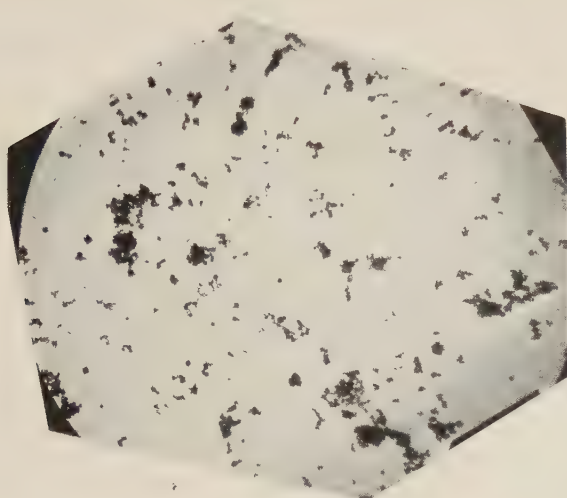
Aufgenommen mit Anordnung I



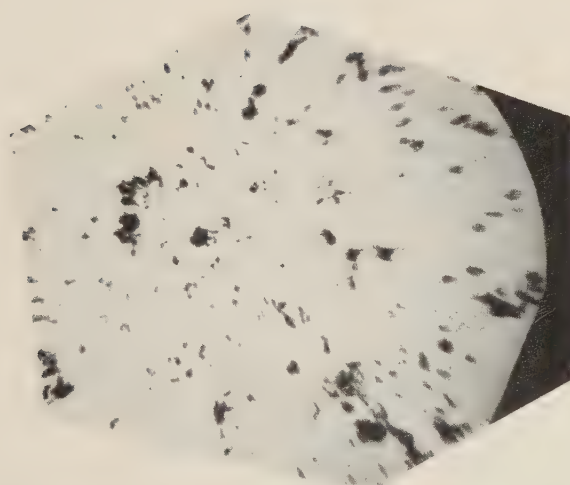
b

Aufgenommen mit Anordnung II

Abb. 4. Magnesiumoxyd auf dicker Folie



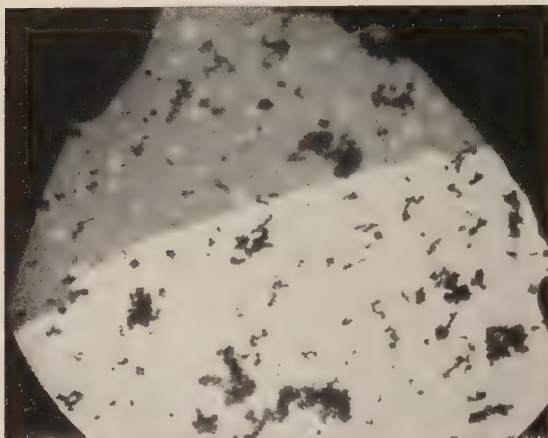
a
auf dünner Folie



b
mit zusätzlicher dicker Folie

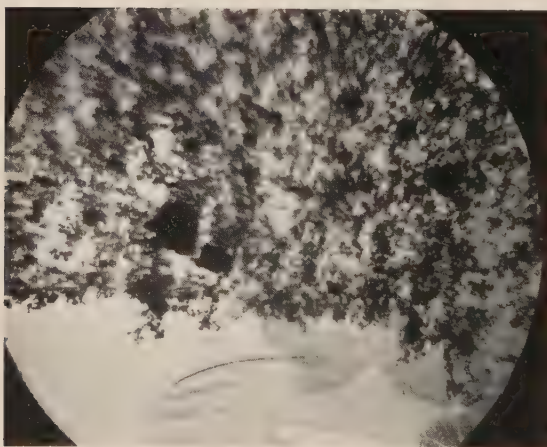
Abb. 5. Magnesiumoxyd, aufgenommen mit Anordnung II

bei „II“ „Verwaschungen“ in radialer Richtung auf, die, besonders bei komplizierteren Objekten, die Ausdeutung erschweren können. Macht man die Annahme, daß die kontrastgebenden Teilchen absolut „schwarz“ sind, so läßt sich das Bild deuten durch die Überlagerung mehrerer Bilder der Trägerfolie, die von Elektronen verschiedener Geschwindigkeit herrühren. Untersucht man die Anordnung „II“ in dieser Richtung genauer, so zeigt sich, daß bei einem Geschwindigkeits-



a

Aufgenommen mit Anordnung I



b

Aufgenommen mit Anordnung II

verlust der Elektronen um 100 V (d. h.: 2%) die Vergrößerung um etwa 7,5% stärker wird. Daraus lassen sich die maximalen Geschwindigkeitsverluste in der Folie zu 50—100 Volt abschätzen. Bei geeigneten Objekten läßt sich auch die von G. RUTHEMANN¹¹⁾ zuerst gezeigte Feinstruktur des Geschwindigkeitsverlust-Spektrum erkennen.

Zur Erkennung des Fehlers kann man auch den Weg einschlagen, daß man auf das Objekt zusätzlich eine dicke Folie legt und sowohl mit als auch ohne diese Folie das Objekt aufnimmt. (Abbildung 5a und 5b.) Besonders eindrucksvoll ist es, wenn eine oder beide Folien gerissen sind, so daß die verschiedenen Foliendicken auf einem Bild erkennbar sind (Abb. 6a und 6b).

Wenn man sich fragt, wie groß ungefähr $\frac{dV}{dv}$ sein darf,

damit die Farbabhängigkeit der Vergrößerung sicher nicht stört, kommt man zu folgenden Überlegungen: Es werde ein Endbilddurchmes-

Abb. 6. Magnesiumoxyd-Präparat mit zusätzlicher Folie, Folie z. T. gerissen

¹¹⁾ G. RUTHEMANN, Ann. d. Physik 6, 113, 1948.

ser von 6 cm angenommen, der anschließend lichtoptisch 5 fach auf 30 cm nachvergrößert werde. Wenn der Unterschied der Durchmesser bei den extrem vorhandenen Geschwindigkeiten kleiner ist als die doppelte Auflösungsgrenze des Auges ($\sim 0,3$ mm) so stört der Fehler offenbar im ganzen Bild nicht. Nimmt man den Geschwindigkeitsverlust (bei dicken Objekten) zu etwa 100 V an, so würde also für „Fehlerfreiheit“ etwa zu fordern sein, daß bei einer Geschwindigkeitsänderung der Elektronen um etwa 100 V die Vergrößerungsänderung kleiner als $1\frac{0}{100}$ sein soll.

Zusammenfassung:

Es wird auf den bei dickeren Objekten störenden Fehler der Abhängigkeit der Vergrößerung von der Elektronengeschwindigkeit hingewiesen. Dieser Fehler ist von dem üblicherweise mit chromatischer Aberration bezeichneten Fehler verschieden. Er ist in der Näherung, in der eine Farbabhängigkeit der Verzeichnung vernachlässigt werden kann, durch geeignete Wahl z. B. des Projektivarbeitspunktes vermeidbar. Bei kontrastschwachen Objekten auf dünner Folie stört er praktisch nicht.

Herrn Prof. Dr. B. v. BORRIES und Herrn Dipl.-Phys. F. LENZ sei auch an dieser Stelle für wertvolle Hinweise gedankt.

[Eingegangen am 3. November 1951]

Aus der Abteilung für Elektronenoptik des Wernerwerks M der Siemens & Halske AG.

Aufbau und Wirkungsweise des Siemens-Beschallgeräts zur Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate

Von O. Wolff

Mit 5 Abbildungen

Für die elektronenmikroskopische Präparationstechnik wurden im Laufe der Jahre besondere Geräte entwickelt, mit deren Hilfe günstige Bedingungen zur Untersuchung verschiedenartiger Objekte herzustellen sind. Im folgenden soll ein einfaches Beschallgerät beschrieben werden, das sich sowohl für die elektronenmikroskopische Präparationstechnik als auch für biologische Untersuchungen über die Schallwirkung ausgezeichnet bewährt hat. Insbesondere lassen sich damit



Abb. 25. Beschallgerät für präparative Aufgaben

Faserschnitte leicht in Fibrillen aufspalten, Gele verflüssigen, Suspensionen und Emulsionen gleichmäßig verteilen, rote Blutkörperchen haemolysieren, Bakterien zerstören, verschiedene Virusarten mehr oder weniger weit inaktivieren und dgl. mehr.

Die Frage, welche Schallfrequenz für die verschiedenen Zwecke der Präparationstechnik am günstigsten sei, soll hier außer Betracht bleiben. Das vorliegende Gerät arbeitet mit einer Frequenz von etwa 11 kHz.

Abb. 1 gibt eine Gesamtansicht des Gerätes. Es hat Abmessungen von etwa $30 \times 27 \times 27 \text{ cm}^3$ und wiegt etwa 11 kg. Die Leistungsaufnahme beim höchsten Vormagnetisierungsstrom beträgt 250 VA (220 V, 1,1 A).

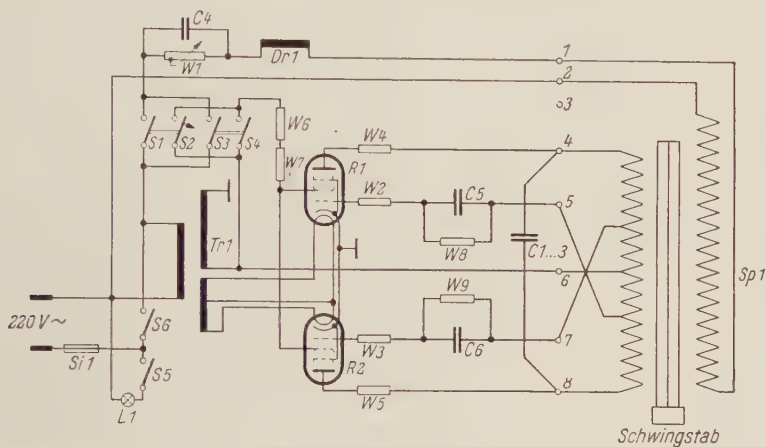


Abb. 2. Wirkstromlauf

Abb. 2 zeigt den Stromverlauf. Der Aufbau der elektrischen Schaltung ist so einfach wie möglich gehalten. Die Schwingungsfrequenz wird mittels zweier Rundfunkröhren (F 2 a 11 von Siemens & Halske) in passender Erregungsschaltung direkt in der Spule, die den Schwingstab umgibt, erzeugt. Die Röhren arbeiten mit Anoden-Wechselspannung, so daß die Schallenergie in Impulsen von je $\frac{1}{50}$ sec Abstand erzeugt wird. Die Vormagnetisierung der Schwingstäbe geschieht ebenfalls mit Wechselstrom, der mit der Anodenspannung phasengleich ist. Der richtige Wert der Vormagnetisierung wird mittels eines Regelwiderstandes eingestellt und ist beim Beschallungsvorgang leicht zu ermitteln. Für ein und denselben Schwingstab ist er praktisch konstant. Im Stromkreis der Vormagnetisierung ist eine Drosselspule (*Dr 1*) vorgesehen, die so dimensioniert ist, daß sie für die Schallfrequenz einen möglichst hohen und für 50 Hz einen genügend niedrigen Scheinwiderstand besitzt. Beim Einschalten des Netzes (*S*₁ bis *S*₄) werden die Kathoden der Verstärkerröhren angeheizt, während die Anodenspannung erst bei der Einleitung des Beschallungsvorganges mit besonderen Schaltern (*S*₆) zugeschaltet wird. Es besteht somit die Möglichkeit, die Präparate sehr schnell zu wechseln, ohne jedesmal die Anheizzeit der Kathoden abwarten zu müssen. Unterhalb der

Schwingspule, die an das Gerät fest angebaut ist, befindet sich eine besonders einschaltbare Beleuchtungseinrichtung (S_5), die es ermöglicht, das Präparat im durchfallenden Licht beim Beschallen zu beobachten.

Abb. 3 zeigt das Gerät geöffnet mit danebenliegenden Schwingstäben. Der normal benutzte Schwingstab (*a*) besteht aus einem in besonderer Weise aufgerollten Nickelblech, das nach allen Richtungen etwa gleiches Trägheitsmoment

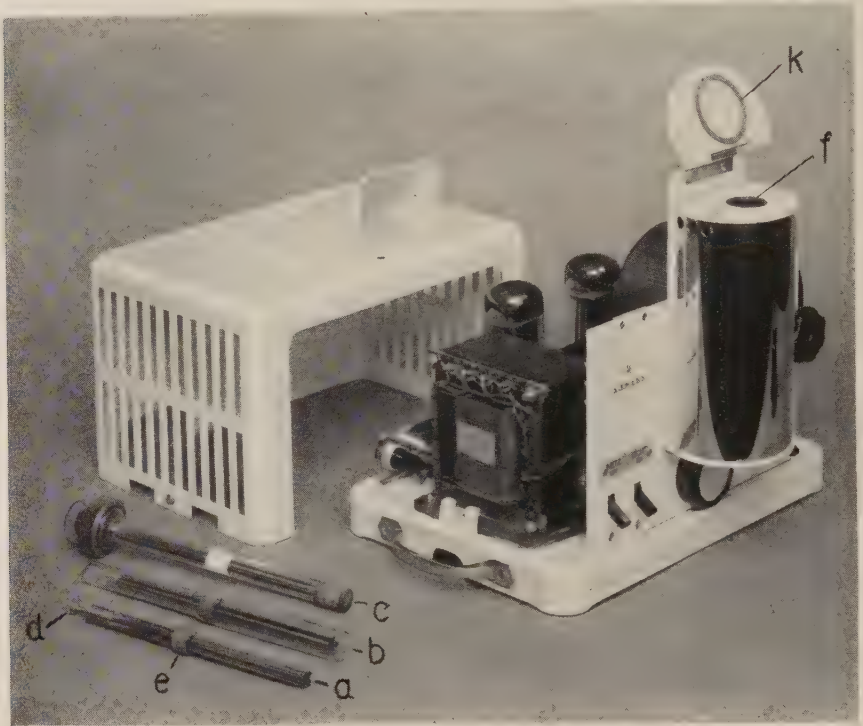


Abb. 3. Gerät geöffnet, mit Schwingstäben

hat und daher sehr knickfest ist. An einem Ende ist eine Hülse angeschweißt, die an einer stabförmigen Verlängerung einen Schwingteller (*d*) besitzt, der den Schall auf das Präparat überträgt. Diese Anordnung hat sich sehr gut bewährt, da der Schwingteller nach beiden Seiten arbeitet. Wichtig ist eine außerordentlich starre Befestigung der Hülse an dem Nickelstab. Sie wurde durch eine besondere Verschweißung mit den vier Wulsten des Schwingstabes erzielt. Etwa auf die Mitte des Stabes wird eine Gummihülse (*e*) festsitzend aufgeschoben, die als Lagerstelle des Stabes dient. Der Stab wird in ein besonders dafür vorgesehenes Reagenzrohr eingesetzt, das in seiner unteren Hälfte verengt ist. Auf die Verengungsstelle stützt sich die Gummihülse des Schwingstabes ab (*b*). Das Reagenzröhrchen mit dem Schwingstab wird in die Öffnung (*f*) der Schwingspule eingesetzt. Die Klappe (*k*) kann zur Dämpfung des Geräusches geschlossen werden.

Abb. 4 zeigt außer dem normalen Schwingstab noch eine Sonderausführung für die Beschallung abgeschlossener Flüssigkeitsmengen. Sie ist insbesondere für die Versuche mit hochinfektiösem Material gedacht. In einem am unteren Ende erweiterten Glasrohr ist ein Gewinding eingekittet. Der Schwingteller wird unter Beigabe einer dünnen Gummimembran an den Schwingstab *angeschraubt*. Der



Abb. 4. Schwingstäbe, normale Ausführung und mit Einrichtung zum Beschallen im abgeschlossenen Raum

Glastopf dichtet die Membran nach außen ab und wird mit einer Überwurfmutter *angebracht*. Die hier gezeigte Sonderausführung gestattet die Beschallung eines Volumens von etwa 10 cm^3 und muß von unten in die Schwingspule eingesetzt werden. Eine Ausführung mit kleinerem Durchmesser ist in Vorbereitung.

Auf die Wiedergabe von Bildern beschallter Präparate kann verzichtet werden (siehe Arbeiten aus dem Institut für Mikromorphologie in dieser Zeitschrift, Heft 3/4 und 5).

Als Beispiel für die biologische Wirkung des Schallstabes mit Schwingteller diene Abb. 5, die die Verminderung der Anzahl lebender Keime in einer Aufschwemmung von *Bacterium coli* darstellt. Auf der Abszisse ist die Beschallzeit in Minuten, auf der Ordinate die Anzahl der noch lebensfähigen Keime pro cm^3 aufgetragen. Beschallt wurde ein Volumen von etwa $1\frac{3}{4} \text{ cm}^3$, aus dem in bestimmten Zeitabständen $0,1 \text{ cm}^3$ zur Keimzählung entnommen wurden. In mehreren Versuchen erwiesen sich die nach 40 bis 70 Minuten untersuchten Proben als steril, doch kann eine sichere Sterilisierung aus technischen Gründen nicht erwartet werden. Die lebenden Keime lassen sich, falls man z. B. Immunisierungsversuche mit dem abgetöteten Material durchführen

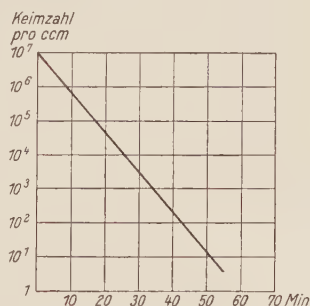


Abb. 5. Beispiel für die Abtötung lebender Keime (*Bact. coli*)

will, mit Hilfe von Agarplatten auslesen, die mit einem Kollodiumfilm überzogen sind. Man bringt das beschallte Material auf den Film, trocknet an, wartet die Entwicklung der überlebenden Keime zu sichtbaren Kolonien ab und sticht diese sorgfältig aus. Das abgetötete Material läßt sich dann vom Kollodiumfilm abschwemmen und zur Immunisierung verwenden.

Herrn Professor H. RUSKA danke ich für die ständige Beratung bei der Entwicklung des Geräts und für dessen laufende Prüfung, seiner technischen Assistentin, Fräulein INGE DIETRICH, für die Durchführung der Keimzählversuche und den Herren Dr. SCHÖFER und DIETER RIECKE für ihre Mitarbeit bei der Entwicklung des Gerätes.

[Eingegangen am 28. Dezember 1951]

Über die Anwendungsmöglichkeiten der neuen Leitz-Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach Heine

Von G. H. M. Gottschewski

Mit 22 Abbildungen

Das Phasenkontrastverfahren nach ZERNIKE dient dazu, ungefärbte, transparente Strukturen (Phasenobjekte) kontrastreich sichtbar zu machen. Das geschieht durch eine scheinbare Umwandlung der Unterschiede der Dicken bzw. Brechzahlen in Intensitätsunterschiede auf Grund eines teilabsorbierenden Phasenplättchens, das an der Stelle im Mikroskop liegt, an der die Abbildung der Lichtquelle erfolgt.

Auch für gefärbte Präparate (z. B. Azan-, Feulgen- und Carmin-Eisessig-Färbungen) kann dieses Verfahren vorteilhaft sein. So lassen manche Spezialfärbungen z. B. das Plasma ungefärbt. Bei der Anwendung des Phasenkontrastverfahrens können die ungefärbt gebliebenen Strukturen gut dargestellt werden, wenn auch die gefärbten, stark absorbierenden Anteile des Präparates häufig in der Phasenkontrasteinstellung keine deutlichen Bilder geben.

Wegen der verschiedenen Aperturen der für das Phasenkontrastverfahren verwendeten Objektive kommt man nicht mit einem festen Durchmesser des Beleuchtungsringes aus. Die meisten der bisherigen Verfahren lösten diese Schwierigkeit, indem sie zu jedem Objektiv unter dem Kondensor eine andere Ringblende anbrachten. Auf einer tellerförmigen Scheibe, die um die Achse drehbar unter dem Kondensor befestigt ist, sind für die entsprechenden Objektive die verschiedenen Ringblenden angeordnet. Bei jedem Wechsel des Präparates und Objektives war in diesen Fällen eine neue Zentrierung notwendig. Alle diese Schwierigkeiten bestehen nicht bei der neuen LEITZ-Einrichtung. Im LEITZ-Spezialkondensor nach HEINE kann längs der optischen Achse im Mikroskop ein Spiegelkörper (SK) mit einer Triebsschraube (Tr) verschoben werden, so daß der Durchmesser des Bildes des Lichtringes (L) sich kontinuierlich bei der Annäherung des SK an das Objekt erweitert oder bei Entfernung vom Objekt verkleinert. Das Bild L' fällt also je nach der Stellung des Kondensors entweder in die Blendenöffnung (vgl. I, III) oder auf den Phasenring Z (II) oder auf den Blendenschirm A (IV), oder die Apertur der Beleuchtungsstrahlen ist größer als die des Objektivs (V), oder L' nimmt eine Zwischenstellung ein (wie z. B. in den Abb. 4, 6, 8 und 17 dargestellt).

Befindet sich der Kondensor in der untersten Stellung, so fällt L' unbeeinflusst in die Blendenöffnung (I), es gelangen die direkten Strahlen zu dem durch die abgelenkten Strahlen erzeugten Bild der Strukturen in der Bildebene und es entsteht ein Hellfeld. Das gleiche gilt für die Stellung III. Die beiden Hellfeldbilder unterscheiden sich durch ihren Kontrastreichtum. Im Hellfeld-1 (I) ist die Apertur des Beleuchtungsringes geringer als im Hellfeld-2 (III).

Fällt L' auf den Phasenring Z (II), so verursacht dieser eine Phasenverschiebung und eine Intensitätsschwächung des durch ihn hindurchgehenden Lichtes. Dies wirkt sich so aus, als ob die direkten Strahlen schon im Objektfeld einen veränderten Schwingungszustand besäßen, während die abgelenkten Strahlen unbeeinflusst die ganze Objektivapertur ausfüllen, weil nur ein zu vernachlässigender Teil von ihnen durch den Phasenring geht. Wir haben hier also folgende Bedingungen erfüllt: Beeinflussung der Energie und Phase des direkten Lichtes, keine Beeinflussung der abgelenkten Strahlen.

Die Dicke der Phasenplatte und ihre Absorption sind so gewählt, daß dann, wenn der Brechungsindex der Struktur größer ist als der des umgebenden Mediums

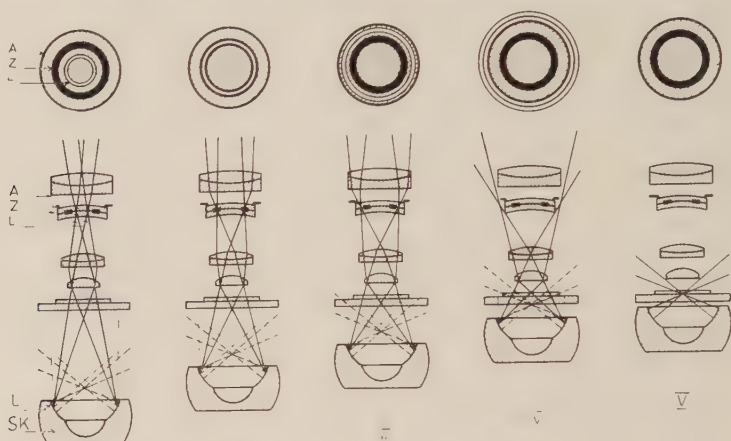


Abb. 1. Schema der Einstellungen I bis V

- I = Hellfeld-1: Ring des Beleuchtungslichtes L' innerhalb des Phasenringes Z abgebildet.
- II = Phasenkontrast: L' auf der teildurchlässigen Phasenplatte Z abgebildet
- III = Hellfeld-2: L' zwischen Z und A abgebildet
- IV = 1. Dunkelfeld: L' verschwindet hinter der Kante der Aperturblende A
- V = 2. (normales) Dunkelfeld: Beleuchtungsapertur des Kondensors liegt oberhalb der Apertur des Objektivs. L' fällt nicht in das Objektiv, nur das Beugungslicht ist wirksam

($n_p > n_m$), die Struktur dunkel auf hellerem Grunde abgebildet wird. In diesem Falle spricht man von einem Dunkelkontrast. Sind die Verhältnisse umgekehrt ($n_p < n_m$), so werden mit dem selben Objektiv die Teilchen heller als die Umgebung abgebildet und man spricht dann von einem Hellkontrast.

Je kleiner das Objekt ist, desto „unverfälschter“ gibt das Phasenkontrastverfahren seine Struktur wieder. Breite Objekte erhalten Haloringe (Beugungsringe) und außerdem werden Innenstrukturen vorgetäuscht. Den Schattierungen oder Aufhellungen inmitten der Objekte entsprechen dann keinerlei Strukturen im Präparat. Sie werden dadurch verursacht, daß hier nicht nur das direkte Licht, sondern auch abgelenkte Strahlenbündel auf den Phasenring fallen und in ihrer Phase verändert werden. Das widerspricht aber der eigentlichen Forderung für die Bildung des Phasenkontrastes. Schmale Lichtringe und schmale absorbierende

Ringe umgehen dieses Mißverständnis teilweise. Diese größere Fehlerfreiheit wird aber mit lichtschwächeren Bildern erkauft.

In der Nähe der hinteren Brennebene befindet sich bei den Phasenkontrast-objektiven eine Aperturblende (A), die dann, wenn das direkte Licht auf den Blendschirm fällt, die direkten Strahlen abfängt, nicht zu der Abbildung der Struktur ins Okular gelangen und somit ein Dunkelfeld entstehen läßt (IV). Ist die Apertur des Beleuchtungsringes so hoch, daß alle Strahlen des direkten Lichtes außerhalb der Objektivapertur zu liegen kommen, dann entsteht ein zweites, das normale Dunkelfeld (V).

Entfernt man das Okular und ersetzt es durch die Einstell-Lupe, so kann man 3 bevorzugte Zwischeneinstellungen beobachten, die durch die Veränderung der Lage von L' zu Z bzw. A entstehen. Einmal wird das Bild der Lichtquelle L' durch die Aperturblende A und zum anderen durch die äußere oder innere Kante des Phasenringes Z beeinflußt. Auch diese 3 Zwischeneinstellungen sind wie die Einstellungen I—V leicht reproduzierbar und sowohl durch die Einstell-Lupe wie auch subjektiv leicht wiederzufinden, da sie sich eindeutig von den anderen noch möglichen Einstellungen unterscheiden.

Anwendung

Zuvor soll die Leitz-Phasenkontrasteinrichtung im einzelnen besprochen werden. Wie die Abb. 2 zeigt, besteht die normale Ausrüstung aus 4 Objektiven: Achromat Pv 10/0,25, Achromat Pv 20/0,45, Apochromat Pv 40/0,70, Apochromat Pv Öl 90/1,15.

Das Objektiv 10/0,25 ist so eingerichtet, daß bei der Normalstellung (Spiegelskörper SK des Kondensors in der untersten Stellung) der Beobachter sofort das Phasenbild sieht. Beim Heben des Sk mit der Triebsschraube gelangt man hier in ein erstes Dunkelfeld und schließlich in das zweite Dunkelfeld. Dieses Suchobjektiv ist in seiner Anwendung mit dem aufsteckbaren Immersionsansatz (vgl. 2a der Abb. 2) auch als Suchobjektiv für die Ölimmersion zu verwenden. Mit aufgestecktem Immersionsansatz sind die Ölimmersion Pv 90/1,15 und dieses Objektiv Pv 10/0,25 in der Höhe so abgestimmt, daß der Forscher das Bild zunächst im Dunkelfeld mit dem Objektiv 10/0,25 suchen und sofort auf die Ölimmersion umschlagen kann. Voraussetzung ist, daß ein Öltropfen auf das Deckglas schon aufgetropft ist. Normalerweise wird man beim Suchen der Objekte mit diesen Einstellungen des 10/0,25-Objektives auskommen. In den seltenen Ausnahmefällen, in denen auch mit diesem Objektiv ein Hellfeld gewünscht wird, muß der ganze Kondensor um etwa 5 mm gesenkt werden. Bei der Verwendung des Immersionsansatzes ist in diesem Sonderfall die Immersionskappe des Kondensors (vgl. 1a der Abb. 2) abzunehmen.

Die 20/0,45 und 40/0,70 Pv-Objektive zeigen alle in dem Schema gezeigten Einstellmöglichkeiten (vgl. Abb. 1 und Abb. 3—10). Besonders hervorzuheben ist die Korrektionsfassung des Apochromaten 40/0,70, mit der man die durch die verschiedenen Deckglassdicken hervorgerufenen Bildfehler ausgleichen kann.



Abb. 2. Leitz-Phasenkontrasteinrichtung. Spezialkondensor nach HEINE (1) mit Triebknopf (Tr) zur Höhenverstellung des darin enthaltenen Spiegelkörpers (SK)

- 1a) die zum Kondensor gehörende aufschraubbare Immersionskappe für Untersuchungen mit Ölimmersion
- 2) achromatisches Trockensystem für Pv 10/0,25
- 2a) aufsteckbarer Immersionsansatz für das Objektiv Pv 10/0,25
- 3) achromatisches Trockensystem Pv 20/0,45
- 4) apochromatisches Trockensystem Pv Apo 40/0,70 in Korrekationsfassung mit automatischem Schärfenausgleich
- 5) apochromatische Ölimmersion Pv Apo Öl 90/1,15
- 6) Filterhalter
- 6a) Tageslicht- und Photofilter
- 7) Einstellupe

Das Objektiv 90/1,15 kann auch mit dem Kondensor ohne Immersionskappe benutzt werden (vgl. 1a der Abb. 2). In diesem Falle ist aber nur die Hellfeld-1 und die Phasenkontrasteinstellung möglich. Da die Apertur des Kondensors durch die aufschraubbare Immersionskappe erhöht wird, ist es möglich, bei der Kombi-

Abb. 3—10. 8 Einstellungen eines ungefärbten Schnittes durch die Augenregion eines Rücken-

schwimmers. Pv 20/0,45 Vergr. 160 \times , vgl. Text

Abb. 3 = Hellfeld-1

Abb. 4 = Zwischeneinstellung

Abb. 5 = Phasenkontrasteinstellung

Abb. 6 = Zwischeneinstellung



nation: Kondensor mit aufgeschraubter Immersionskappe und Pv 90/1,15 Öl-immersion auch das Hellfeld-2 und das erste Dunkelfeld zu erzielen. Die Immersionskappe ist mit der Unterseite des Objektträgers durch einen Öltropfen zu verbinden. Soll mit der Ölimmersion Pv 90/1,15 auch das normale, 2. Dunkelfeld erzielt werden, ist statt des Spezialkondensors nach HEINE ein Dunkelfeldkondensor D 1,20 A zu verwenden (vgl. unten).

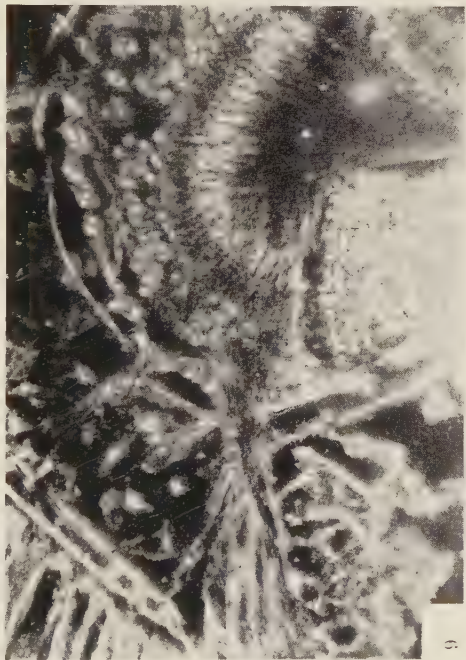
Die Zentrierung der Lampe, um homogenes Licht zu erhalten, und des Kondensors zur optischen Achse erfolgt in der üblichen Weise. Besonders leicht läßt sich der Kondensor zentrieren, wenn der Spiegelkörper mit der Triebsschraube so hoch gestellt ist, daß L' teilweise von dem Blendenrand gedeckt wird. Man nimmt zu diesem Zweck das Okular heraus und ersetzt es durch die Einstell-Lupe. Die Licht-ringe, die außerhalb der Abbildung des scharf eingestellten Beleuchtungsringes zu sehen sind, sind Reflexe an optischen Flächen, deren Beseitigung keinerlei praktischen Nutzen ergeben hat. Die Verstellung des Spiegelkörpers SK, durch die die verschiedenen Einstellungen: Hellfeld-, Phasenkontrast-, Dunkelfeldbild und Zwischeneinstellungen verursacht werden, ruft keinerlei Änderung in der Zentrierung hervor. Ebenso wenig ist bei abgestimmten Objektiven eine Nachzentrierung nach einem Objektwechsel notwendig.

Von den verschiedenen Variationsmöglichkeiten, die mit dem LEITZ-Phasenkontrastverfahren möglich sind, sind zunächst 8 Einstellungen herausgegriffen (Abb. 3–10), die die im letzten Abschnitt der Einleitung beschriebenen Einstellungen demonstrieren sollen. Die Auswahl der Objekte für einen solchen Zweck ist sehr schwierig, weil selten ein Präparat in allen, mit diesem Verfahren möglichen Einstellungen optimale Bilder gibt¹⁾.

Hier handelt es sich um einen ungefärbten Schnitt durch die Augenregion eines Rückenschwimmers. Links oben ist ein Teil der Sehzellen mit dazwischenliegenden und vor allem am Grunde auf der Basalmembran stärker vorhandenen Pigmentzellen zu sehen. Die Basalmembran schließt den dioptrischen Apparat ab. Sie ist in allen 8 ausgesuchten Einstellungen zu sehen, leuchtend weiß oder dunkel in den Zwischeneinstellungen (Abb. 4, 6, 8), oder nur dunkel im Phasenkontrast (Abb. 5). Es folgt die Sehnervenzone, die wiederum durch eine Membran gegenüber der Lamina ganglionaris abgegrenzt ist. Durch die Lamina gangl. ziehen die Nervenfasern, die die Sehnervenzellen mit der Medulla externa verbinden. Beim Durchtritt durch die den Lobus opticus einschließende Membran ist das äußere Chiasma (Chiasma externa) zu erkennen. Unterhalb der Medulla externa folgt die zweite Überkreuzung der Sehnerven (Chiasma interna) und rechts unten wird die Medulla interna sichtbar. Diese Nervenstränge sind ebenfalls in allen Einstellungen erkenn-

¹⁾ Den Herren cand. phil. F. COULON und cand. phil. F. WALTER bin ich für die Herstellung der Abbildungen 3–20 zu Dank verpflichtet.

- Abb. 7 = Hellfeld-2
 Abb. 8 = Zwischeneinstellung
 Abb. 9 = 1. Dunkelfeld
 Abb. 10 = 2. Dunkelfeld



bar; am vorteilhaftesten in der Stellung zwischen Phasenkontrast und Hellfeld-2 und zwischen Hellfeld-2 und 1. Dunkelfeld. Außerdem sind Bindegewebsfetzen vorhanden. Einige dieser Zellen sind bei der Stellung II (vgl. Schema der Abb. 1) im Dunkelkontrast in ihrer Gestalt mit dem Zellkern zu erkennen. Zudem ist rechts oben eine Trachee angeschnitten, die aber nicht ganz in der Schärfeebene liegt. In den Zwischenstellungen, dem Phasenkontrast und auch im Hellfeld-2 wird sie sichtbar. In diesem Präparat haben wir es also mit stark absorbierenden Bestandteilen (Pigmentzellen) und gleichzeitig mit schwach absorbierendem Gewebe zu tun; außerdem gleichzeitig mit der Faserstruktur der Nerven und der zellulären des Bindegewebes der Lamina und der Medulla.

Die Abb. 3 ist ebenso wie die Abb. 7 ein Hellfeldbild. Der Unterschied zwischen beiden zeigt deutlich, daß die Auflösung in dem Hellfeld-1 (Abb. 3) eine geringere ist als im 2. Hellfeldbild (Abb. 7). Subjektiv ist in dem 1. Hellfeldbild kaum etwas zu unterscheiden. Es ist eine Erfahrungstatsache, daß erst durch häufigeres Vergleichen des Phasenkontrast- und des Hellfeldbildes Strukturen im Hellfeld sichtbar werden, die zunächst „übersehen“ wurden. Die Photoplatte stellt mehr dar, als beim subjektiven Durchmustern zu sehen ist. Im Hellfeld-1 fällt der Licht-ring (L') unbeeinflusst in die Blendenöffnung (vgl. Schema I), im Hellfeld-2 wird L' zwischen Phasenring und Aperturblendenrand abgebildet (vgl. Schema III).

Die Abb. 4, 6 und 8 sind einander ähnlich. Die Strukturen erscheinen plastischer; vor allem treten besonders deutlich die Faserstrukturen hervor. In allen 3 Fällen ist die Einstellung so, daß ein Teil des Lichtes des Lichtinges L' sehr nahe an dem Innen- oder Außenrand des nur teilabsorbierenden Zernike-Ringes, bzw. im Falle der Abb. 8 sehr nahe am Blendenrand vorbeiläuft.

Die Abb. 5 (vgl. Schema II) stellt einen Phasenkontrast dar, bei dem in der gewohnten und bekannten Weise L' auf den teildurchlässigen Phasenring (Z) fällt. Da der Ringdurchmesser von L' kleiner ist als der von Z , durchlaufen alle Beleuchtungsstrahlen den Phasenring und werden infolgedessen in ihrer Phase beschleunigt. Der größte Teil der Beugungsstrahlen läuft dagegen ungestört neben der Phasenschicht vorbei. Besonders klar erscheinen hier die Chiasmata und die Zellen. Strukturen, deren Brechungsindex höher ist als der des umgebenden Mediums ($n_p > n_m$) erscheinen im Dunkel- und Strukturen, bei denen $n_p < n_m$ ist, im Hell-Kontrast.

Die Abb. 9 stellt ein 1. Dunkelfeld und die Abb. 10 (vgl. Schema IV und V) ein normales Dunkelfeld dar. Subjektiv fallen im Dunkelfeldbild besonders gut die Pigmentkörnchen auf, die rotbraun aufleuchten. Der Unterschied zwischen Präparaten von helladaptierten und dunkeladaptierten Tieren wird hier besonders deutlich. Während im 1. Dunkelfeld die Nervenstrukturen noch relativ kontrastreich zur Abbildung gelangen, verschwinden diese Strukturen in dem normalen Dunkelfeld fast völlig.

Diese 8 Bilder sind als die bezeichnendsten aus der Reihe der möglichen Einstellungen gewählt. Die markantesten dieser Einstellungen sind: Hellfeld, Phasenkontrast und Dunkelfeld. Nach einmaligem Zentrieren kann man ohne Zuhilfenahme der Einstell-Lupe sofort diese Einstellungen wiederfinden. Der Spiegel-

körper SK wird längs der optischen Achse verschoben, und das einmal gesehene Bild, bzw. die einmal gewählte Einstellung läßt sich leicht wieder finden.

Für die Darstellung der Fibrillen, Kollagenfasern, Blutkörperchen, Chondriosomen und Hefezellen ist im allgemeinen die Zwischeneinstellung an der Aperturblende den anderen Einstellungen vorzuziehen. Als Faustregel kann man sagen, daß alle Strukturen, die im Dunkelfeld gut sichtbar sind, auch in den Zwischeneinstellungen mit Vorteil dargestellt werden können. Ein Wechsel der Einstellungen während der Beobachtungen, der von dem Beobachter nach einiger Zeit, ebenso wie die Betätigung der Feineinstellungen unbewußt ausgeführt wird, läßt das

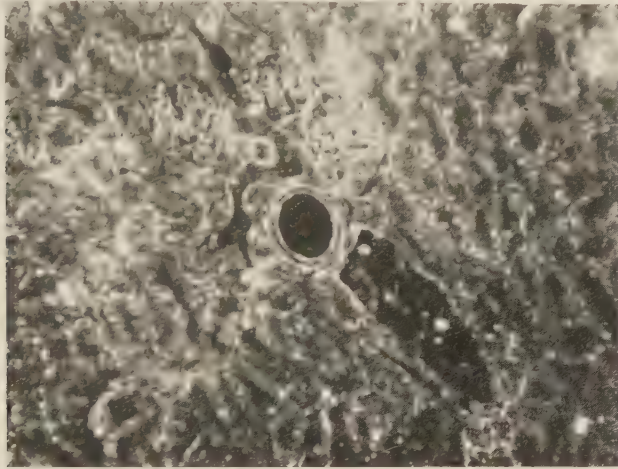


Abb. 11. Schnitt durch die Rattenniere (ungefärbt), Dunkelfeld vgl. Text. Objektiv Pv 10/0,25 mit aufsteckbarem Immersionsansatz. Vergr. 125 \times

Präparat in so viel verschiedenen Aspekten erscheinen, daß die Deutung einer Struktur sehr erleichtert wird. Der geübte Mikroskopiker will nach kurzer Zeit diese Variationsmöglichkeit nicht mehr missen. Für den Anfänger ist es wichtig zu wissen, daß die 3 Haupteinstellungen jederzeit auch von ihm reproduziert werden können.

Immer wieder überrascht bei dieser Einrichtung die Plastik der Bilder. Besonders deutlich wird dies in den gewählten Zwischeneinstellungen.

Die folgende Bildserie von einem ungefärbten Schnitt durch eine Rattenniere beginnt mit einem Dunkelfeld, das mit dem 10 0,25 Pv-Objektiv mit aufgestecktem Immersionsansatz aufgenommen ist. In der Mitte des Bildes (Abb. 11) ist die Arteriola afferens, angrenzend Nierenkörperchen, Hauptstückzelle und Sammelrohr zu sehen. Durch einfaches Umschlagen kann sofort das Pv 90 1,15-Objektiv auf die Bildmitte eingestellt werden. Die Abb. 12 zeigt, daß im Hellfeld wenig zu erkennen ist, während dagegen in der Abb. 13 im Phasenkontrast, die Tunica intima mit den Endothelkernen, die T. media mit Muskulatur, Kollagen und elastischen

Membranen deutlich sichtbar werden. Die Abb. 14 stellt ein Nierenkörperchen mit Harnpol dar. Besonders gut kommen die Haupt- und Schaltstücke zur Darstellung. Die Zellkerne mit Nucleolen, die Bowmansche Kapsel, die Membrana propria und die Glomerulusschlingen in der Kapsel sind in allen ihren Einzelheiten erkennbar. Diese Aufnahme 14 ist mit einer Pv 70 1,10 Fl-Öl-immersion aufgenommen. Auch dieses Objektiv ist mit dem 10 0,25 Obj. mit aufgestecktem Immersionsansatz und der Öl-immersion Pv 90 1,15 so in der Höhe abgestimmt, daß zwischen diesen 3 Objektiven ohne Nachstellen der Mikrometerschraube gewechselt werden kann. Die Hauptstückzelle (Abb. 15) ist ebenfalls mit dem Pv 70 1,10 Fl-Öl-immersionsobjektiv aufgenommen. Den Zellen sitzt als Differenzierung des Protoplasmas ein Flimmerbesatz der Cuticula auf. Die Kerne der Hauptstückzellen, die Lichtung und auch die Membrana propria werden deutlich. Im Gegensatz zu gefärbten vergleichbaren Schnitten bleiben hier die zarten Fibrillen erhalten. Auch die Gitterfasern der Membrana pr. sind darstellbar, wenn auch nicht ganz mit einer solchen Klarheit, wie nach einer Del-Rio-Hortega-Silberfärbung.

Auch der Vorgang der Hämolyse ist in seinen verschiedenen Stadien durch die Möglichkeit der Variation der Einstellung besonders gut festzuhalten. Den zentri-fugierten, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen und wieder zentri-fugierten Erythrocyten wurde Kaninchenserum mit Meerschweinchenkomplement zugesetzt. Zunächst blieb das normale Bild roter Blutkörperchen erhalten. Die schüsselförmige Oberfläche ist leicht darstellbar, das normale Blutkörperchen erscheint in der Mitte dunkel mit hellen aufgewölbten Rändern, dunklem Außenrand und hellem Haloring. Die Haloerscheinungen nehmen im weiteren Verlauf der Hämolyse ab, die Erythrocyten werden dunkler und kugelig. Kurz vor der Hämolyse wird der Erythrocyt fast schwarz und „läuft dann aus“, so daß nur als schwacher Schatten die „leere Membran“ übrigbleibt. Man kann bei diesen teil-absorbierenden Erythrocyten durch die Beobachtung mit der LEITZ-Phasenkontrasteinrichtung neue Erkenntnisse gewinnen. So ist die Oberflächenstruktur der Erythrocyten, die bisher nur mit dem Ultropak dargestellt werden konnte, auch bei der Zwischeneinstellung z. B. zwischen Hellfeld-2 und erstem Dunkelfeld sichtbar zu machen. In dieser Einstellung scheint die „Schüssel“ bei der Hämolyse immer flacher zu werden, um plötzlich zu verschwinden. Bei dieser Einstellung ist aber ein Farbwechsel nicht zu beobachten.

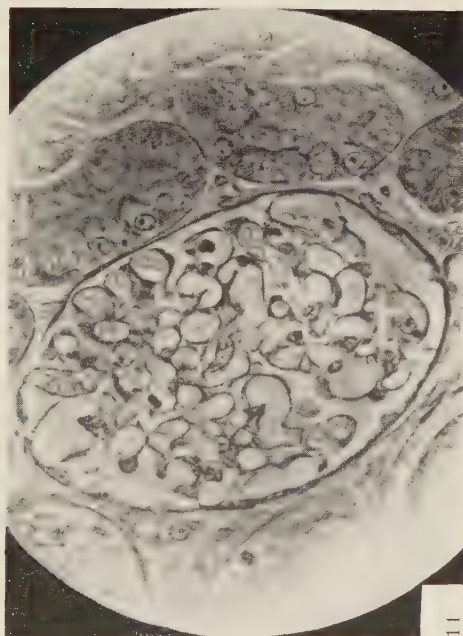
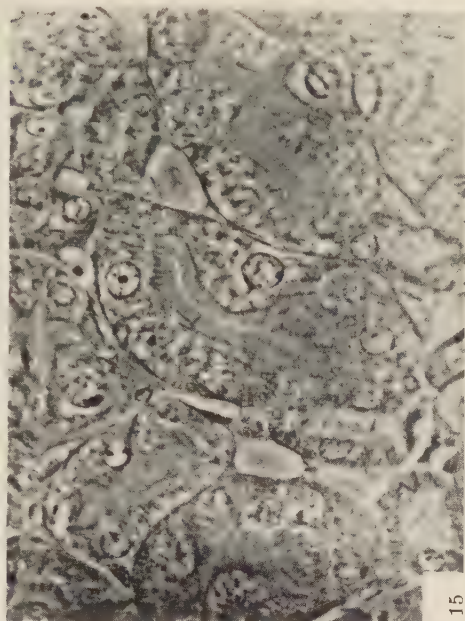
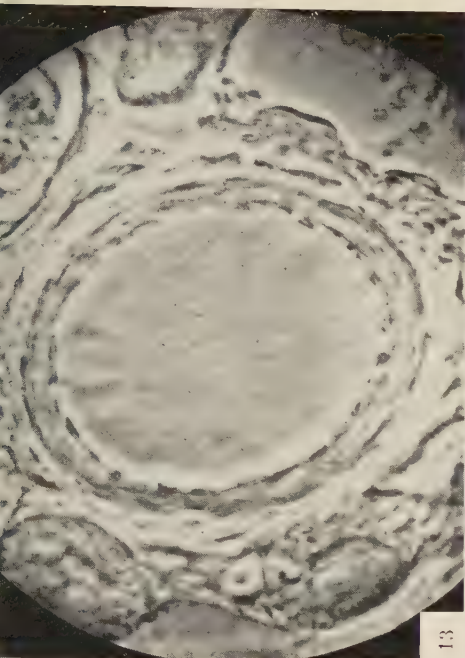
Der große Vorteil des Phasenkontrastverfahrens liegt selbstverständlich in der Beobachtung lebender Objekte. Für cytologische und bakteriologische Schnellmethoden und in der Gewebebezüchtung wird das Phasenkontrastverfahren schon lange mit Erfolg benutzt. Von den LEITZ-Werken ist insbesondere für diese Zwecke das oben erwähnte Pv-Objektiv 70 1,10 Fl-Öl zusätzlich entwickelt. Der relativ große freie Abstand (0,2 mm) und die größere Ausdehnung des gleichzeitig

Abb. 12. Arteriola afferens. Hellfeld Objektiv Pv 90/15. Vergr. 1500×

Abb. 13. Arteriola afferens. Phasenkontrast, vgl. Text. Objektiv Pv 90/1,15. Vergr. 1500×

Abb. 14. Nierenkörperchen mit Harnpol. Phasenkontrast, Objektiv Pv 70/1,10. Vergr. 1310×

Abb. 15. Hauptstückzelle mit Wimpernsaum. Phasenkontrast. Obj. Pv 70/1,10. Vergr. 1675×



scharf gesehenen Tiefenbereiches sind seine besonderen Kennzeichen. Die etwas geringere Ausdehnung dieses Bereiches beim Pv-Apo 90/1,15 ist vor allem bei der subjektiven Beobachtung kein Nachteil, weil dadurch die Möglichkeit gegeben ist, auch geringe Tiefenunterschiede zwischen einzelnen Objektdetails zu erkennen. Für viele Untersuchungen ist dieses höhere Tiefenauflösungsvermögen besonders wichtig. Bei der Schnelldiagnose zieht man aber im allgemeinen einen größeren freien Arbeitsabstand, größere Ausdehnung des gleichzeitig sichtbaren Tiefenbereiches und stärkere Kontraste vor, selbst wenn dadurch Details verloren gehen

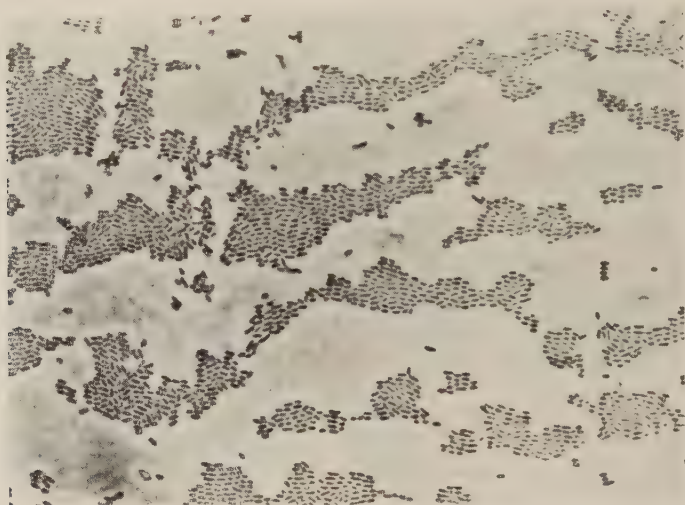


Abb. 16. Coli-Bakterien. Phasenkontrast. Obj. Pv 40/0,70. Vergr. 575 \times vgl. Text

sollten. So hat sich auch bei Untersuchungen über den Formwechsel der Bakterien das Pv-Objektiv 70/1,10 sehr bewährt. Die Abb. 16 und 17 stellen einen Coli-Stamm bei Stellung II im Dunkelkontrast (Abb. 16) und in der Zwischeneinstellung Hellfeld-2 — 1. Dunkelfeld (Abb. 17) dar, aufgenommen mit dem 40/0,70 Pv-Objektiv. Bei den Abb. 18, 19 und 20 ist dagegen das Pv 70/1,10-Objektiv verwandt.

Die Kulturen werden nach der Methode G. POETSCHKE (4) auf Agar in Petrischalen angelegt. Die Agarschicht wurde möglichst dünn und klar gehalten, um keine störenden Effekte zu bekommen. Die von den Deckgläsern nicht bedeckten Stellen sind mit Paraffin abgedichtet. Bessere Resultate erzielt man in plan-

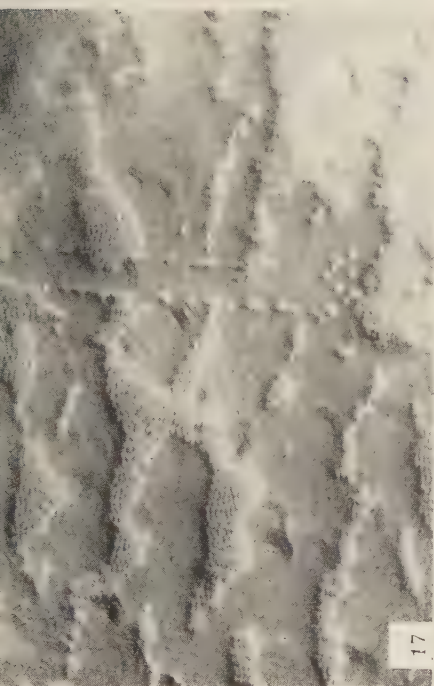
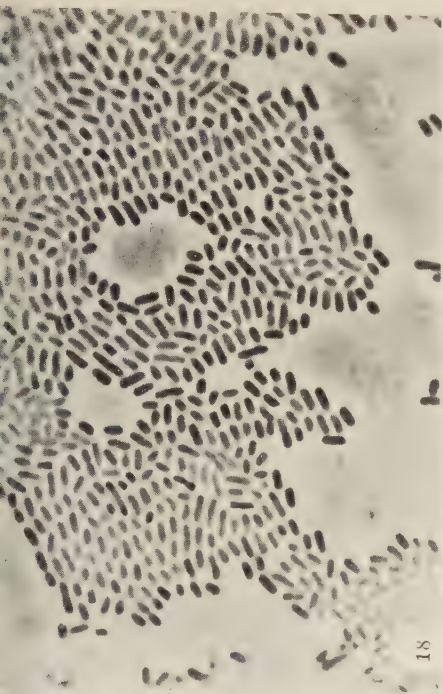
Abb. 17. Coli-Bakterien. Zwischeneinstellung zwischen Hellfeld-2 und 1. Dunkelfeld, vgl.

Abb. 16, Obj. Pv 40/0,70. Vergr. 575 \times

Abb. 18. Coli-Bakterien. Phasenkontrast, Obj. Pv 70/1,10. Vergr. 1300 \times

Abb. 19. Streptokokken Phasenkontrast, Obj. Pv 70/1,10. Vergr. 1150 \times

Abb. 20. Pneumokokken. Phasenkontrast, Obj. Pv 70/1,10. Vergr. 1300 \times



parallelen Kammern von $1,10$ mm Tiefe, die ein Agarfilm deckt. Für diagnostische Zwecke genügt aber die obige Methode.

Die Coli-Bakterien (gramnegativ) der Abb. 16—18 erscheinen als sporenlose Körper von mittlerer Größe und geringer Beweglichkeit. Die Enden sind abgerundet und das eine erscheint etwas schlanker als das andere. Eine Struktur des Inneren war hier niemals feststellbar. Ohne Schwierigkeiten verträgt die Aufnahme mit dem $70 \times 1,10$ eine mehrfache lineare Nachvergrößerung. Das Dunkelfeld ergab hier wegen der zu dicken Agarschicht kein gutes Bild.

Die Streptokokken (grampositiv) Abb. 19 erscheinen hier, in einer Kultur nach Penicillin-Zusatz, in Kettenform, unbeweglich und sporenlos. Es sind Kugelformen, ovale und seltener auch Scheibenformen zu erkennen. Bemerkenswert sind „gequollene“ Kokken und vakuolige Degenerationen, die innerhalb der Kettenschlingen zu erkennen sind.

Die sporen- und geißellosen Pneumokokken (grampositiv, Abb. 20) unterscheiden sich deutlich durch ihre Lanzettform, wobei sie häufig mit den stumpfen Enden beieinander liegen, während sie mit den spitzeren nach außen gerichtet sind. Infolge des Penicillin-Zusatzes fanden sich hier auch vakuolige Degenerationen, Stäbchen- und runde Formen. Bei den Pneumokokken ist eine Art Membran und im Inneren sind dunklere Stellen, die an „Kernstrukturen“ erinnern, zu finden. Ein anderer Stamm zeigte keinerlei Differenzierung.

Bei der Beobachtung der lebenden Stämme im Phasenkontrast kann man zumindest dieselben Strukturen erkennen, wie bei einer Färbung. Im Gegensatz zu dieser sind aber auch die fortlaufenden Veränderungen in den Kulturen, z. B. bei Penicillin-Zusatz, im Phasenkontrastverfahren laufend zu verfolgen, ohne daß das Wachstum selbst gestört wird. Aufnahmen mit dem $90 \times 1,15$ Pv-Objektiv bringen mehr Details und sie sind immer dann den $70 \times 1,10$ -Aufnahmen vorzuziehen, wenn es sich um dünne Präparate handelt.

Von H. GÄRTNER (1) ist mit dem Leitz-Phasenkontrastverfahren in Gemeinschaft mit dem Institut für Film und Bild, Göttingen, ein Film: „Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten)“ aufgenommen, so daß an dieser Stelle auf dieses Anwendungsgebiet nicht eingegangen zu werden braucht. Es mag nur erwähnt werden, daß von den Leitz-Werken hier wieder die Fertigung der sogenannten „umgekehrten Panphots“ aufgenommen wurde. Neuentwickelte Carellflaschen mit besonders dünnen Deckplatten ermöglichen die Anwendung auch der Ölimmersion Pv $70 \times 1,10$ Fl. Über die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Kombination Leitz-Pv-Einrichtung und Polarisations-einrichtung wird demnächst berichtet. Es seien nur noch zwei Punkte herausgestellt. Die Verwendung des monochromatischen Lichtes und des Dunkelfeldkondensors D $1,20$ A.

Wichtig ist bei der Mikroskopie die spektrale Zusammensetzung des Beleuchtungslichtes. Man benutzt bei der subjektiven Beobachtung ein leichtes Grün- oder Blaufilter und bei der Mikrophotographie das Grünfilter. Selbstverständlich muß die Auswahl des Filmes oder der Platte dem Filter entsprechen. Zu einem strengen Grünfilter gehört eine grünempfindliche Emulsion usw. Es ist auch nutz-

ringend, eine Aufnahmeserie mit verschiedenen Filtern herzustellen, weil man subjektiv wegen der verschiedenen Empfindlichkeit von Film und Auge leicht zu Fehlschlüssen kommt. Besonders angenehm fällt bei der Leitz-Phasenkontrastoptik auf, daß bei der Verwendung der Apochromate für hohe Vergrößerungen, wie zu erwarten, eine sehr gute Farbkorrektion gewährleistet ist, im Gegensatz zu den bisher gebräuchlichen achromatischen Objektiven. Die Filterung bei den



Abb. 21. Flügelschuppe des Schmetterlings *Macroglossa*. 2. Dunkelfeld, Pv 20/0,45 und HEINE-Spezialkondensor für Hellfeld, Phasenkontrast und Dunkelfeld. Vergr. 600 >

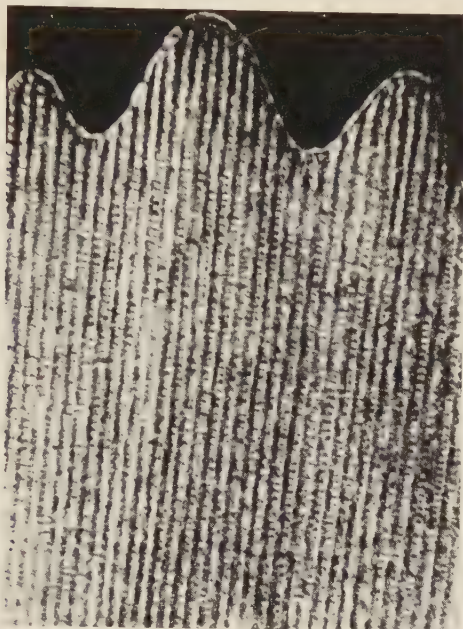


Abb. 22. Teil der in Abb. 21 dargestellten Flügelschuppe. 2. Dunkelfeld, Pv 90/1,15 und D 1,20 A Dunkelfeldkondensor, vgl. Text. Vergr. 1050 >

achromaten muß selbstverständlich auch viel strenger sein als bei den Apochromaten und dies macht sich dann wieder in der Lichtausbeute bemerkbar.

Die Kombination zwischen dem Phasenkontrastobjektiv Apo Pv 90/1,15-Ölimmersion und dem Leitz-Dunkelfeldkondensor D 1,20 A führt zu dem bisher unerreichbaren Dunkelfeldbild. In Verbindung mit dem Phasenkontrastkondensor nach HEINE und Immersionskappe ist es bei Verwendung des 90 1,15-Obj. möglich, das 1. Dunkelfeld und nicht das 2. normale zu erhalten. Umgekehrt geben Ölimmersionen-Objektive mit einem Zwischenstück mit Irisblende „Irtis“ und dem Dunkelfeldkondensor D 1,20 A niemals die Auflösung, die bei der Kombination Pv 90 1,15 und D 1,20 A erhalten wird. Die beiden Aufnahmen (Abb. 21, 22) zeigen ein für hohe Vergrößerungen nicht einmal besonders günstiges Dunkelfeldobjekt: Eine Flügelschuppe eines Schmetterlings. Die Aufnahme

21 ist mit dem Objektiv 20/0,45 und dem Heine-Kondensor und die Aufnahme 22 mit dem Objektiv 90/1,15 und dem D 1,20 A gemacht. Jeder, der einmal solche Schuppen im Dunkelfeld beobachtet hat, wird feststellen, daß die Auflösung mit der Ölimmersion optimal ist.

Zusammenfassung

Nach einer Einführung in das Phasenkontrastverfahren werden an Hand von Beispielen die Vorzüge besprochen, die die Leitz-Phasenkontrasteinrichtung dem Biologen und Mediziner bietet. Nach einer einmaligen Zentrierung ist es möglich, nicht nur Hellfeld, Phasenkontrast und Dunkelfeld für alle Objektive sofort und sicher einzustellen, sondern der Mikroskopiker hat auch die Möglichkeit, durch reproduzierbare Zwischeneinstellungen die Struktur besonders plastisch zu beobachten.

Schrifttum

- 1) GÄRTNER, H.: Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Hochschulfilm des
- 2) Institutes für Film und Bild, Göttingen 1952.
- 3) HÖPKER, W.: Phasenkontrastuntersuchungen am Rattenhirn. Im Druck.
- 4) KEUNING, F. J.: Das Phasenkontrastverfahren in der Mikroskopie. *Mikroskopie* **3/4** (1950) 49—61.
POETSCHKE, G., und BOMMER W.: Phasenkontrastmikroskopische Lebendbeobachtung zur
- 5) Morphologie der Streptokokken. *Ztbl. f. Bakteriologie* 1950, 140—152.
RICHTER, R.: Eine vereinfachte Erklärung des Phasenkontrastmikroskops. *Optik* **2** (1947) 342—345.
- 6) ZOLLINGER, H. U.: Phasenmikroskopische Beobachtung an Zellkulturen. *Mikroskopie* **3** (1948) H. 1/2, 1—11.

[Eingegangen am 12. 7. 1952]

Der Einfluß der Fixierung auf das Kernvolumen

Von **Horst-Günter Eulig** und **Wolfgang Mond**

Mit 7 Abbildungen

In der Kernvolumenmessung besitzen wir, nachdem von BENNINGHOFF der Begriff des funktionellen Kernödems aufgestellt wurde, eine nahezu ideale Methode um Funktionszustände der Zellen abzulesen. Die Messung muß aber im allgemeinen an fixiertem und gefärbtem Material vorgenommen werden, da es nur bei sehr wenigen Geweben gelingt, so dünne Präparate zu gewinnen, daß eine Lebendbeobachtung unter dem Phasenkontrastmikroskop oder im Dunkelfeld möglich ist. Es war deshalb notwendig, den Einfluß der Fixierung und der entwässernden Nachbehandlung auf die funktionell geschwollenen bzw. geschrumpften Kerne zu untersuchen.

Die Fixierung und Nachbehandlung der Präparate bis zur Färbung und Einlebung bewirkt eine Schrumpfung derselben; ebenso schrumpft wasserreiches, z. B. embryonales Gewebe, im allgemeinen stärker als wasserärmeres (PATTEN, PHILPOTT). Da nun die funktionell geschwollenen Kerne wasserreicher sind als die der nicht in gesteigerter Tätigkeit befindlichen Zellen war zu befürchten, daß die wasserreichen Kerne stärker schrumpfen als die wasserärmeren, so daß die im Leben vorhandene Differenz des Volumens zwischen geschwollenen und nicht geschwollenen Kernen nach der Fixierung nicht mehr bestehen bleibt. Wie unten gezeigt wird, ist das bei einigen Fixierungsmitteln auch tatsächlich der Fall.

Das Ziel unserer Untersuchungen war nun festzustellen, welche der gebräuchlichsten Fixierungsmittel und Intermedien sich am besten für die Kernmessung eignen und inwieweit man aus der im gefärbten Präparat gefundenen Volumendifferenz zwischen geschwollenen und nicht geschwollenen Kernen Rückschlüsse auf die im Leben vorhandene Differenz ziehen kann.

Über die chemische Zusammensetzung, den PH, den osmotischen Druck, die Dielektrizitätskonstante usw. der Fixierungsmittel sind schon von zahlreichen Autoren die mannigfaltigsten Untersuchungen angestellt worden (BERG, FISCHER, FISCHINGER, ROSE, SEKI, v. TELLYESNICZKY, VOSS, WERNER, ZEIGER u. a.). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen beziehen sich aber in erster Linie auf strukturelle Veränderungen und berühren unsere Fragestellung nicht. Es ist auch nicht möglich, die an isolierten Proteinkörpern erhobenen Befunde ohne weiteres auf die lebenden Zellen zu übertragen. Für jede spezielle Fragestellung

muß deshalb durch vergleichende Untersuchungen das beste Fixierungsmittel empirisch ermittelt werden.

Material und Methode:

Für unsere Versuche benötigten wir ein möglichst einheitliches und nicht dicker als $10\ \mu$ starkes Gewebematerial, da sonst eine Untersuchung mit dem Phasenkontrastmikroskop nicht möglich war. Wir wählten daher lebende Froscherythrocyten, die wir durch Herzpunktion gewannen.

Um in möglichst kurzer Zeit möglichst viele Kerne registrieren zu können verwandten wir die Photographie. Zur photographischen Aufnahme wurden die Erythrocyten in kleine mit Froschringer-Lösung gefüllte Kammern verbracht. Hierzu werden auf einen Objektträger zwei feine Seidenfäden gelegt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Zellen sedimentierten sich nach kurzer Zeit am Boden dieser Kammer ab und bildeten so eine gleichmäßige Schicht.

Sie wurden dann folgendermaßen mit dem Phasenkontrastmikroskop photographiert: Das Präparat wurde ohne Zwischenschaltung eines Spiegels direkt von unten mit einer Punktlichtlampe mit Blaufilter beleuchtet. Wir photographierten die Erythrocyten mit dem Objektiv Ph 90/1,30 Oel. und Phasenkontrastkondensor ohne Okular auf einen in eine Leicakassette (ohne deren Optik) eingespannten Positivfilm. Die Belichtungszeit betrug $\frac{1}{4}$ Sec.

Wir kopierten den Film so, daß eine 3000fache Endvergrößerung resultierte. Dies erreichten wir dadurch, daß wir mittels eines unter den gleichen Bedingungen photographierten Objektmikrometers den Focomaten 1c (Leitz) auf die gewünschte Vergrößerung einstellten.

An diesen Kopien bestimmten wir die Kernvolumina nach folgender Methode: Mit dem Planimeter wurde jeder Kern dreimal (zur Erhöhung der Meßgenauigkeit) umfahren. Aus dem gemessenen längsten Durchmesser und dem Planimeterwert berechneten wir das Kernvolumen. — Wenn man sich die Fläche des Kerns um den längsten Durchmesser als Achse rotiert denkt, dann entsteht ein Rotationsellipsoid. Für die Planimeterwerte in μ^2 (unter Berücksichtigung des dreimaligen Umfahrens) und die zugehörigen Längsdurchmesser in μ bei 3000facher Vergrößerung wurde eine Tabelle errechnet und daraus die betreffenden Kernvolumina abgelesen. Diese Methode ist zwar mühsamer aber wesentlich genauer als das alleinige Messen der aufeinander senkrecht stehenden Durchmesser oder das Messen mit dem Okularmikrometer (PUFF, VOSS). — Diese Art der Volumenbestimmung ist natürlich nur auf Kerne beschränkt, deren Form weitgehend der eines Rotationsellipsoides angenähert ist. Wenn man auf die Kante gestellte Erythrocyten betrachtet kann man sich leicht davon überzeugen, daß es sich bei ihren Kernen tatsächlich um Rotationsellipsoide handelt, denn sie zeigen die gleiche Form und Größe wie die der flach liegenden Erythrocyten.

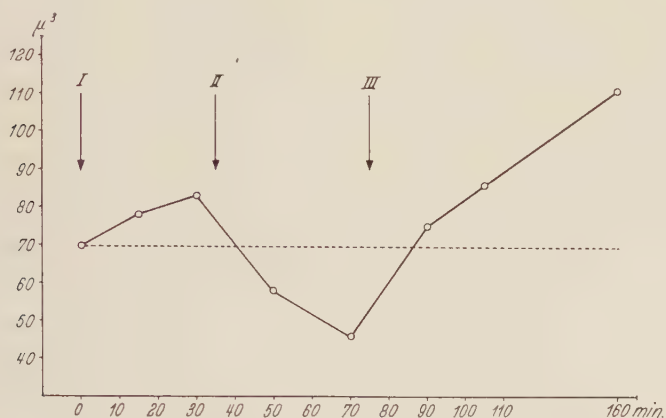
Vorversuch:

Verbringt man Froscherythrocyten in eine mit Froschringer 1 : 100 000 verdünnte Adrenalin- oder Azetylcholinlösung, so tritt eine reversible Kernschwellung bzw. -schrumpfung auf. Den Vorgang der reversiblen Kernschwellung und -schrumpfung zeigt der in Tabelle 1 und in Abbildung 1 graphisch dargestellte Versuch, aus dem gleichzeitig zu entnehmen ist, daß die Erythrocyten durch die Behandlung nicht geschädigt wurden, da die Überlebenszeit mindestens $2\frac{1}{2}$ Stunden betrug. Der Versuch wurde nach 160 Minuten abgebrochen.

Wir gaben in eine mit Froschringer gefüllte Kammer frisch entnommenes Froschblut. Nach fünf Minuten wurde durch gleichzeitiges Absaugen der Ringerlösung auf der einen Kammerseite und unter Zugabe einer mit Froschringer 1 : 100 000 verdünnten Adrenalinlösung die Kammer durchspült, wobei darauf zu achten war, daß die Durchspülung die Erythrocyten nicht aus der Kammer entfernte. Dies wurde solange fortgesetzt, bis die Ringerlösung vollständig durch die Adrenalinlösung ersetzt war. (Dabei darf nur reine Adrenalinlösung verwandt

Tafel I

Zeit in Min.	Pharmaka	Kernvolumen in μ^3 (je 100 Kerne)	Mittlerer Fehler des arithm. Mittl.
0	Froschringer-Lösung	69,81	1,26
15	Adrenalin 1 : 100 000		
30		77,94	0,94
35	Azetylcholin 1 : 100 000	83,30	1,1
50		57,74	1,0
70		46,18	0,6
75	Adrenalin 1 : 100 000		
90		75,35	1,0
105		86,40	1,46
160		111,31	1,6

Abb. 1. Ordinate: Kernvolumen in μ^3 . Abszisse: Zeit in Minuten

- I 1:100 000 verd. Adrenalin zugegeben
 II 1:100 000 verd. Azetylcholin zugegeben
 III 1:100 000 verd. Adrenalin zugegeben

Die gestrichelte Linie gibt das Volumen der unbehandelten Kerne in Froschringer-Lösung an

werden. Die im Handel befindliche, mit 0,4% Acetonchloroform versetzte Supra-
 reninlösung zeigt, wie wir in Vorversuchen feststellen konnten, keinerlei Wirkung
 auf die Erythrocytenkerne.) 15 und 30 Min. nach Zugabe des Adrenalins wurden
 die Kerne photographiert. Nach 35 Min. wurde in gleicher Weise, durch Absaugen
 und Durchspülen, das Adrenalin durch Azetylcholin ersetzt. 15 und 35 Min.
 später, d. h. 50 und 70 Min. vom Beginn des Versuches an gerechnet, photogra-
 phierten wir wieder die gleichen Kerne. 75 Min. nach Versuchsbeginn ersetzten
 wir dann in der gleichen Weise das Azetylcholin durch Adrenalin und machten
 die Aufnahmen anschließend nach 90, 105 und 160 Min. Die angegebenen Kern-
 volumina stellen Mittelwerte von je 100 gemessenen Kernen dar. Wie aus Tab. II
 ersichtlich ist, liegen die Werte der Kernvolumina bei einmaliger Gabe von Adre-

Tabelle II

Lebende Erythrocytenkerne	Kernvolumen in μ^3	Mittlerer Fehler des arithm. Mittl.
Nach 30 Min. Adrenalin	83,40	1,2
Nach 30 Min. Ringer	69,65	1,1
Nach 30 Min. Azetylcholin	56,30	1,0

nalın bzw. Azetylcholin niedriger als beim fortlaufenden Versuch, was wir auf eine Sensibilisierung der Kerne zurückführen möchten.

Versuchsanordnung:

Um bei gleichartigen Zellen eine Kernvolumendifferenz zu erzeugen, setzten wir frisch entnommenen Froscherythrocyten in je einer Kammer entweder mit Frosch-ringer 1 : 100 000 verdünntes Adrenalin oder Azetylcholin und als Kontrolle reine Ringerlösung zu. Diese Präparate wurden, nachdem die Pharmaka und der Frosch-ringer 30 Min. eingewirkt hatten, photographiert und anschließend verschiedenen Fixierungsmitteln und der entwässernden Nachbehandlung unterworfen.

Als Fixierungsmittel wurden absoluter Alkohol, Bouins Fixierungsgemisch, Carnoysche Flüssigkeit, Formol (36%) 1:3, „Susa“ und Zenkersche Flüssigkeit verwandt. Bei der Auswahl gerade dieser Fixierungsmittel waren u. a. folgende Gesichtspunkte maßgebend. In der uns zugänglichen Literatur wurden sie zur Kernmessung am häufigsten verwandt und sie enthalten außer der Osmiumsäure alle wesentlichen Bestandteile der Fixierungsmittel. Wegen der geringen Tiefenwirkung und der schlechten Färbbarkeit ist diese an dickeren Geweben, an denen die Kernmessungen gewöhnlich vorgenommen werden, zur Fixierung nicht geeignet, weshalb wir von ihrer Verwendung, obwohl sie bei unseren Präparaten möglich gewesen wäre, Abstand nahmen.

Wir führten die Fixierung und Nachbehandlung der Präparate in folgender Weise durch: In Formol, Susa und Zenker wurde je 24 Std. fixiert, anschließend 24 Std. gewässert und die Präparate wieder für je 24 Std. durch 70%, 96% und absol. Alkohol geführt. Mit Bouin wurde ebenfalls 24 Std. fixiert und dann für je 24 Std. durch 70%, 80%, 96% und absol. Alkohol geführt. Nach dreistündiger Fixierung mit Carnoy übertrugen wir die Präparate für 24 Std. in absol. Alkohol. Die Dauer der Fixierung mit absol. Alkohol betrug 24 Std. Bei der geringen Dicke unserer Präparate hätte eine kürzere Einwirkungszeit der Fixierungsmittel ausgereicht. Da bei der Stückfixierung aber die Zellen dem Fixierungsmittel länger ausgesetzt werden müssen, haben wir, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, diese lange Fixierungszeit gewählt.

Die weitere Nachbehandlung erfolgte bei allen Präparaten in gleicher Weise (24 Std. Methylbenzoat, 30 Min. Benzol). Außer bei Formol- und Susa-Fixierung wurde auch Zedernöl als Intermedium untersucht. Danach wurden alle Präparate je 5 Min. durch Xylol, absol. Alkohol, 96%- und 70%igen Alkohol in aqua dest.

Tabelle III

Fixierungs- mittel	Kerne behandelt mit	Inter- medium	μ^3	b	P	D	S
Zenker	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				45,3	14,9
			43,60	0,7	47,7		
			36,45	0,58	47,7		
			30,0	0,57	46,7		
Zenker	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Zedernöl				74,5	25,2
			38,92	0,53	53,4		
			27,60	0,5	60,4		
			22,30	0,4	60,4		
Bouin	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				59,4	19,7
			39,21	0,62	53,0		
			27,25	0,39	60,9		
			24,60	0,4	56,3		
Bouin	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Zedernöl				37,7	19,2
			30,86	0,33	63,0		
			23,95	0,38	65,6		
			22,41	0,33	60,2		
Abs. Alkohol	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				21,8	8,95
			33,75	0,5	59,5		
			28,60	0,5	58,9		
			27,70	0,45	50,8		
Abs. Alkohol	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Zedernöl				17,1	7,85
			29,04	0,45	65,2		
			25,85	0,38	62,9		
			24,80	0,31	56,0		
Carnoy	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				5,1	2,3
			28,40	0,46	65,9		
			28,40	0,54	59,2		
			27,0	0,4	52,0		
Carnoy	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Zedernöl				22,1	8,3
			27,44	0,43	67,1		
			25,45	0,44	63,5		
			22,47	0,43	60,1		
Susa	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				16,0	6,5
			36,20	0,49	56,6		
			33,10	0,66	52,5		
			31,20	0,6	44,6		
Formol	Adrenalin Ringer Azetylcholin	Benzol				6,3	2,8
			33,13	0,45	60,3		
			31,62	0,51	54,6		
			31,17	0,54	44,6		

b bedeuten: b Mittlerer Fehler des arithm. Mittl.

P Schrumpfung der Kerne durch Fixierung und Nachbehandlung in Prozent

D Enddifferenz zwischen geschwollenen und geschrumpften Kernen in Prozent

S Significans zwischen „Adrenalin- und Azetylcholin-kernen“

geführt. Aus dem aqua dest. färbten wir alle Präparate mit 1:10 verdünntem Hämatoxylin-Hansen über 48 Stunden. Dann wurde durch die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und nach Xylol in der Kammer in Caedax eingedeckt.

Die gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt und in den Abbildungen 2—7 graphisch dargestellt. Für jeden angegebenen Wert wurden je 100 und mehr Kerne gemessen.

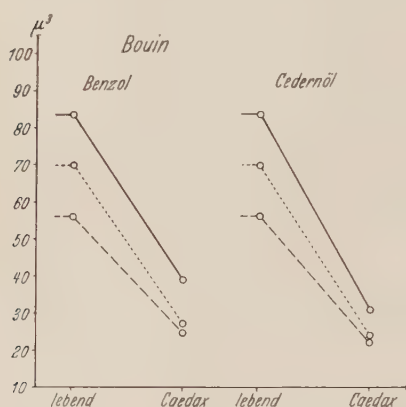


Abb. 2

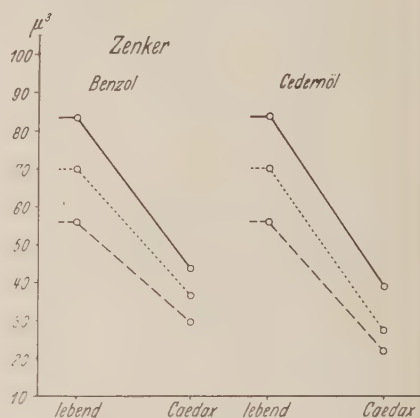


Abb. 3

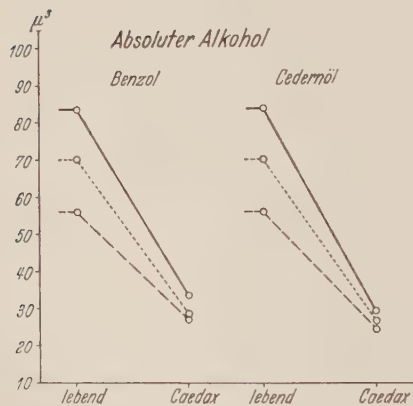


Abb. 4

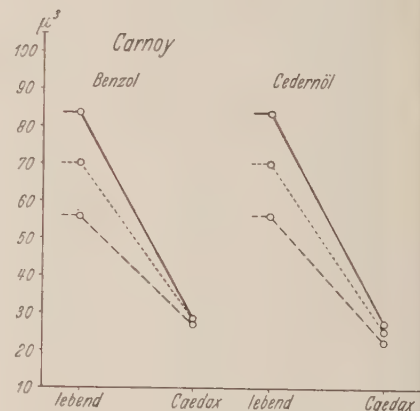


Abb. 5

Abb. 2. In dieser und den folgenden Abbildungen bedeuten:

Ordinate: Kernvolumen in μ^3

Abszisse: Beobachtung vor und nach Fixierung, Färbung und Eindeckung in Caedax

Ausgezogene Kurve: mit Adrenalin behandelte Kerne

Punktierte Kurve: Kerne in Froschinger-Lösung

Gestrichelte Kurve: mit Azetylcholin behandelte Kerne

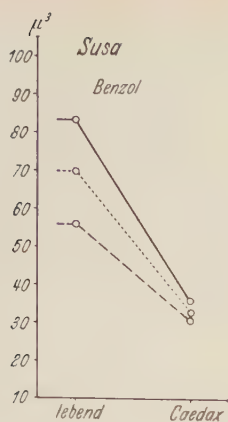


Abb. 6

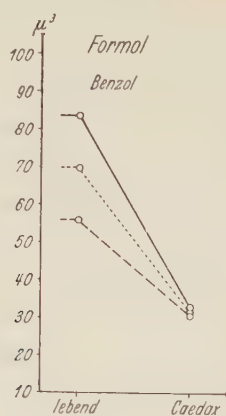


Abb. 7

Diskussion der Ergebnisse:

Obwohl die Erythrocyten nicht innerviert sind, reagieren ihre Kerne auf stärkste Verdünnungen von Adrenalin bzw. Azetylcholin mit Schwellung bzw. Schrumpfung, so daß sie ein gutes Testobjekt für die Wirkungsweise der Fixierungsmittel bilden, zumal bei ihnen eine Lebendbeobachtung besonders gut möglich ist.

Aus den in den Tabellen und Kurven dargestellten Versuchen ist zu ersehen, daß die Wahl des Fixierungsmittels und des Intermediums die Kernmessungsergebnisse entscheidend beeinflusst. Setzt man das Kernvolumen der lebenden Zellen gleich 100%, so sind die Volumina der gefärbten Kerne um Werte zwischen 44,6% und 67,1% geschrumpft. Die Kernvolumendifferenz der lebenden Froscherythrocyten zwischen durch Adrenalin zur Schwellung gebrachten und durch Azetylcholin geschrumpften Kernen beträgt 50%. Dagegen schwankt die Kernvolumendifferenz am Ende der Fixierung und Nachbehandlung um Werte zwischen 5,1% und 74,5% (Tab. III). Auf Grund dieser Prozentzahlen muß man zu dem Schluß kommen, daß die Kerne nach den verschiedenen Fixierungsmitteln zwar alle eine etwa gleiche Schrumpfungstendenz haben, aber die „großen und kleinen“ Kerne nicht im gleichen Verhältnis schrumpfen. Bei Formol und Susa haben wir auch Zwischenwerte gemessen, und zwar nach Abschluß der Fixierung, nach der Anwendung von absol. Alkohol und nach Benzol. Ein starker Abfall des Kernvolumens erfolgt einmal nach dem Fixierungsmittel, zum anderen nach Methylbenzoat-Benzol. Hierin zeigt sich eine Übereinstimmung mit den von HERTWIG an Leberzellkernen erhobenen Befunden. Aus diesem Grunde haben wir uns bei den weiteren Reihen auf die Anfangs- und Endwerte beschränkt.

Als ein wesentlicher Befund ist also hervorzuheben, daß die großen, wasserreichen „Adrenalinkerne“ stärker schrumpfen als die kleinen, wasserarmen „Azetylcholinkerne“ bei Fixierung mit absol. Alkohol, Carnoy, Formol und Susa, während sie bei Anwendung von Bouin und Zenker etwa im gleichen Ausmaß schrumpfen. (Für das gegensätzliche Verhalten der Kerne nach Zenker-Zedernöl haben wir keine Erklärung.) Die Schrumpfungstendenz der Kerne und die Enddifferenz zwi-

schen geschwollenen und geschrumpften Kernen ist nicht nur vom Fixierungsmittel, sondern auch vom Intermedium abhängig. Die absoluten Werte liegen nach Methylbenzoat-Benzol durchweg höher als nach Zedernöl. Anscheinend wirkt also das Zedernöl noch stärker entwässernd als Methylbenzoat-Benzol.

Diese Befunde lassen sich vielleicht folgendermaßen deuten: Durch die aufsteigende Alkoholreihe und die Intermedien wird den Kernen fast alles Wasser entzogen. Wenn die Kernmembran anpassungsfähig bleibt, kann sie der Volumenverminderung des Kerninhaltes folgen. Da die Kernvolumenänderung auf Wasseraufnahme bzw. -abgabe beruht, müßten am Ende der Entwässerung alle Kerne die gleiche Größe aufweisen, da ja keine Substanzvermehrung im Kern stattgefunden hat. Wenn trotzdem am Ende der Reihe sich Differenzen erhalten haben, so kann das nur darauf beruhen, daß die entsprechenden Fixierungsmittel die Kernmembran von vorneherein in dem Sinne verändert haben, daß sie ihre Anpassungsfähigkeit weitgehend verloren hat und so dem schwindenden Kerninhalt nicht mehr voll folgen konnte.

Als wesentliches Ergebnis unserer Untersuchungen ist also festzustellen, daß bei Bouin und Zenker nach Methylbenzoat-Benzol als Intermedium die Schlußdifferenz der im Leben wirklich vorhandenen Differenz zwischen geschwollenen und geschrumpften Kernen etwa entspricht. Bei den anderen von uns untersuchten Fixierungsmitteln läßt die Enddifferenz keine Schlüsse auf die im Leben vorhandene Differenz zu; sie liegt durchweg niedriger, um bei Carnoy-Benzol und Formol-Benzol vollständig zu verschwinden (Tab. III, Abb. 5 und 7). Für die Kernvolumenmessung glauben wir auf Grund unserer Untersuchungen die Fixierungsmittel Bouin und Zenker mit Methylbenzoat-Benzol als Intermedium als am besten geeignet empfehlen zu können.

Zusammenfassung:

Nachdem es uns bei Froscherythrocytenkernen durch Zugabe von Adrenalin bzw. Azetylcholin gelungen war, ein funktionelles Kernödem zu erzeugen, benutzten wir diese, um den Einfluß verschiedener Fixierungsmittel (absol. Alkohol, Bouins Fixierungsgemisch, Carnoysche Flüssigkeit, Formol (36%) 1:3, „Susa“ und Zenkersche Flüssigkeit) auf das Kernvolumen zu prüfen. Dabei zeigte es sich, daß die bei Froscherythrocyten im Leben vorhandene Differenz zwischen den mit Adrenalin und Azetylcholin behandelten, also geschwollenen und geschrumpften Kernen von 50% nur bei Fixierung mit Bouin und Zenker unter gleichzeitiger Verwendung von Methylbenzoat-Benzol als Intermedium im gefärbten und in Caedax eingedeckten Präparat erhalten bleibt. Bei den übrigen Fixierungsmitteln läßt die Enddifferenz keine Schlüsse auf die im Leben vorhandene Differenz zu; sie liegt durchweg niedriger, um bei Carnoy-Benzol und Formol-Benzol vollständig zu verschwinden. Die Schrumpfungstendenz der Kerne und die Enddifferenz zwischen den geschwollenen und geschrumpften Kernen ist nicht nur vom Fixierungsmittel, sondern auch vom Intermedium abhängig. Die Kernvolumina werden nach Zedernöl durchweg kleiner als nach Methylbenzoat-Benzol. Auf Grund dieser Befunde glauben wir die Fixierungsmittel Bouin und Zenker mit Methylbenzoat-Benzol als Intermedium als am besten für die Kernvolumenmessung geeignet empfehlen zu können.

Schrifttum

BENNINGHOFF, A.: Anat. Nachr. **1** (1950). — BERG, W.: Arch. mikrosk. Anat. **62** (1903). — FISCHER, A.: zit. nach ZEIGER. — HERTWIG, G.: Z. mikrosk. anat. Forschung **23** (1931). — KRANTZ, H.: Z. Zellforschung **35** (1951). — PATTEN, BR. M. and PHILPOTT, R.: Anat. Record **20** (1921). — PISCHINGER, A.: Z. Zellforschung **26** (1937). — PUFF, A.: Methode zur planimetrischen Kernvolumenbestimmung an uneinheitlichem Kernmaterial. Z. wiss. Mikroskopie **61** (1952), noch nicht erschienen. — ROSE, M.: Mem. de l'Acad. polon. des sciences et des lettres. Classe des sciences math. et nat. **8** (1935). — SEKI, M.: Z. Zellforschung **26** (1937). — TELLYES-NICZKY, K. v.: Zit. nach ZEIGER. — VOSS, H.: Anat. Anz. **82** (1936). — WERNER, CL. F.: Z. Zellforschung **20** (1934). — ZEIGER, K.: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig (1938). — Weitere Literatur über Kernvolumenmessung bei KRANTZ, über die Theorie der Fixierung bei ZEIGER.

[Eingegangen am 16. 7. 1952]

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. A. BENNINGHOFF)

Methode zur planimetrischen Kernvolumenbestimmung an uneinheitlichem Kernmaterial

Von Alexander Puff

Mit 2 Abbildungen

Die Kernvolumenbestimmung im histologischen Schnitt ist mit einer Anzahl von Fehlerquellen behaftet. Unsere beim Kernmessen gemachten Erfahrungen veranlaßten uns, nach Wegen zu suchen, die möglichst viele dieser Fehlerquellen ausschalten.

Ursprünglich wurden nur die runden Kerne herausgesucht, diese mit dem Okularschraubenmikrometer gemessen und bei der Berechnung des Volumens als Kugeln betrachtet. Bei Epithelkernen z. B. geht das an.

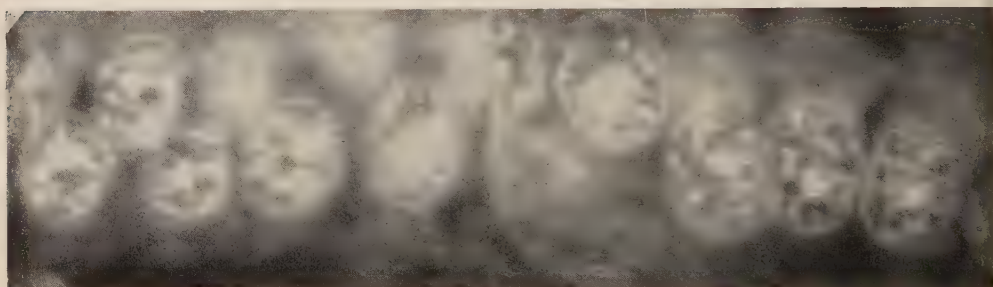


Abb. 1. Sehzellkerne. Dunkelnetzhaute

Abb. 2. Sehzellkerne. Hellnetzhaute

Beim Vermessen der Sehzellkerne in der Retina ergaben sich aber insofern schon Schwierigkeiten, daß sich die relativ kugeligen Dunkelkerne aus räumlichen Gründen bei Belichtung nicht gleichförmig nach allen Seiten hin ausdehnen, sondern daß sie bei Volumenvergrößerung auch gleichzeitig eine Streckung erkennen lassen. (Vgl. Abb. 1 und 2.)

Es entstehen so mehr oder weniger einheitliche Drehkörper, die man als Rotationsellipsoide auffassen kann. Wir gingen dann dazu über, beide Achsen zu messen und mit Hilfe der Inhaltsformel für das Rotationsellipsoid

$$V = \frac{4\pi ab^2}{3}$$

zu berechnen.

Diese heute sehr gebräuchliche Methode läßt sich aber nur für einheitliches Kernmaterial anwenden. VOSS wies bereits darauf hin, daß man besonders bei geometrisch uneinheitlichem Kernmaterial mit dieser Arbeitsweise nicht zum Ziele kommt.

In der oben bezeichneten Formel bleibt ja Äquator- und Polkrümmung unberücksichtigt. In extremen Fällen können 2 Kerne mit gleichlangen a-Achsen und gleichen b-Achsen, die nach der obigen Formel den gleichen Inhalt haben müßten, sich in ihrem tatsächlichen Volumen wie 1 : 3 verhalten. Daß hier also eine große Fehlerquelle liegt, ist nicht von der Hand zu weisen.

VOSS schlug nun vor, von der Schnittfläche des Kernes auszugehen, diese zu planimetrieren und den Flächeninhalt auf eine gleichgroße Kreisfläche zu beziehen und daraus das Kugelvolumen zu berechnen.

Aber auch diese Methode birgt noch große Fehler. Von ausschlaggebender Bedeutung für den Inhalt eines Rotationskörpers ist ja auch seine äußere Form, nicht nur der Inhalt der rotierenden Fläche. Ich darf dies an einem Beispiel erläutern.

3 Kerne wurden nach ihren Schnittflächen planimetriert. Alle drei hatten denselben Planimeterwert von 40 (3maliges Umfahren der Kernfläche bei 3000facher Vergrößerung):

der Kugelkern mit den Achsen $a = b = 21,5$ mm hatte den Inhalt von $190 \mu^3$,

der zweite mit der Längsachse $b = 24,5$ mm hatte den Inhalt von $170 \mu^3$

und der dritte mit der Längsachse $b = 28,5$ mm hatte den Inhalt von $144 \mu^3$.

Ich glaube, daß aus diesem Beispiel mit großer Deutlichkeit die Bedeutung der Form, d. h. Größe der Äquator- und Polkrümmung hervorgeht.

Es muß also ein Weg beschritten werden, der es noch erlaubt, ein großes Kernmaterial zu bewältigen und variationsstatistisch auszuwerten und der andererseits eine befriedigende Genauigkeit ergibt.

Es liegt nun nahe, die geübten Methoden zu verknüpfen und damit einen Weg größerer Exaktheit ohne wesentliche Mehrarbeit zu begehen.

2 meßbare Größen ermöglichen mit ausreichender Genauigkeit eine Volumenbestimmung. Es ist dies der Flächeninhalt der größten Schnittfläche des Rotationskörpers und sein größter Durchmesser, den wir als b bezeichnen wollen.

Folgende Formel (abgeleitet aus der Achsen-Inhaltsformel und der Flächenformel) gestattet es, aus den beidengegebenen Größen den Inhalt direkt zu errechnen.

$$V \text{ (Inhalt des Rotationskörpers)} = \frac{0,8488 \cdot F^2}{b}$$

Hierbei ist F die planimetrierte Fläche und b der größte Durchmesser. 0,8488 ist eine Konstante, die π enthält.

Mit Hilfe dieser Formel kann man eine Tabelle aufstellen für die Kernvolumina in μ^3 , bei der in der Ordinate die μ^2 (— planimetrierte Fläche) und auf der Abszisse die jeweiligen zugehörigen größten Achsen in μ aufgetragen sind.

Praktisch kann man die Tabelle insofern noch vereinfachen, daß man an Stelle des Flächeninhaltes in μ^2 den abgelesenen Planimeterwert direkt einsetzt. Ebenso

verfährt man mit b , indem man den linearen μ -Wert in mm bei der entsprechenden Vergrößerung angibt.

So würde z. B. der μ^2 -Wert bei einer 3000fachen Vergrößerung mit 27000 zu multiplizieren sein (da es sich empfiehlt, den Kernumriß 3mal addierend zu umfahren, um einen planimetrisch guten Mittelwert zu erhalten) und der lineare μ -Wert mit 3000.

Auf diese Weise sind wir in der Lage, ohne weitere Rechenmanipulationen durch Ablesen der beiden Werte an den Meßgeräten den Volumeninhalt eines jeden Kernes in μ^3 direkt aus der Tabelle zu entnehmen.

Schrifttum

JAKOBI: Roux Arch. **141**, 585ff. (1942). — PUFF: Morph. Jahrb. **92**, 60ff. (1952). — VOSS: Anat. Anz. **82** (1936).

[Eingegangen am 25. Juli 1952]

Structure of the Collagenous Tissue in the Cirrhotic Liver, a Contribution to the Geometry of Sectioning

Hans Elias and Edwin H. Spanier

With 14 Figures

Investigations on the morphogenesis of cirrhosis carried out during the last three years with Doctor HANS POPPER, have shown that, depending on the kind of initiation of the cirrhotic process, two fundamentally different types of collagenous tissue are found.

I. Collagenous fibers

Inflammation of the delicate connective tissue sheaths that surround the intralobular bile ducts and arterioles may be an early stage in the development of cirrhosis.

In this condition, known as pericholangiolitis, fibroblasts appear in these trabeculae together with other cells. Soon after this initial cellular infiltration, collagenous fibers develop in this area.

Fibers are threads. In other words, they are essentially onedimensional structures, since the thickness of delicate fibers is negligible compared to their length.

We are frequently led to faulty interpretations concerning the structure of sectioned material since three-dimensional organs present themselves to us in the form of extremely thin slices, viewed from one direction only.

Therefore, it is necessary to submit the sectioned material to a geometrical analysis.

It has been explained in a previous paper ('51) that the section of a fiber is, in the vast majority of cases, a dot or comma. Only very rarely can a fiber appear as a long line in a section, namely in those exceptional cases in which the fiber lies for a considerable portion of its length in the cutting plane. If fibers were mathematical lines and a microtome section a mathematical plane, then all sections of fibers would be points, since the probability for a line to lie in a specific

plane is $\frac{1}{\infty}$.

Now it so happens that many connective tissue fibers are, for all practical purposes, mathematical lines, since their thickness lies at the limits of microscopic visibility ($0,2 \mu$). However, the microtome sections are far from mathematical planes. Indeed, compared with the thickness of a single connective tissue fiber, they are very thick slices.

Therefore, the sections of fibers appear in a histological slide as points only when they run exactly perpendicularly to the cutting plane (fig. 1, left). When they are cut obliquely, they appear as more or less short lines which one can follow by focusing up and down; or one can bring them completely into focus by stopping down the substage diaphragm (fig. 1, center).

The angle α which the fiber forms with the cutting plane can be determined by

the formula $\tan \alpha = \frac{t}{p}$, where t stands for the thickness of the section and p

for the length of the projection into the cutting plane of the fiber piece, i. e. that apparent length which can be measured with the micrometer. The word "apparten length" is not meant here in its original sense, as used in descriptive geometry and

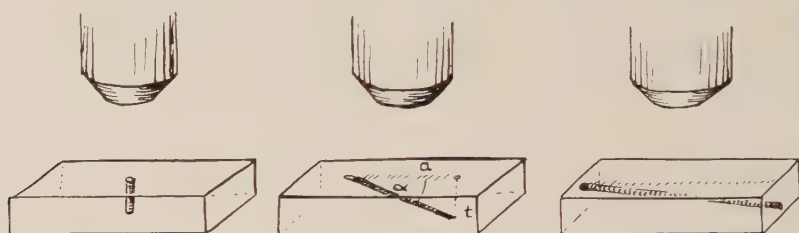


Fig. 1. Three pieces of fibers contained in a slice and their projections as seen through the microscope. To conform with the text, the letter p should be substituted for a .

geometrical optics. In these branches of mathematics, the word "apparent length" is the angle of vision under which the object appears. Sometimes the term is used to designate original length \times magnification. In this case, we mean the real length of the projection of a fiber piece into a plane perpendicular to the optical axis of the microscope.

In order to arrive at the probable numerical distribution of fiber projections of certain lengths, it may be assumed that straight fibers running in all directions are distributed in space in such a manner that the density of fibers is even for any given direction, and that the same density exists in all directions. A parallelepiped, representing a limited area of a microtome "section" (better to be called a slice) is thought to be located in this fiber pervaded space. The width of the slice is c , its length is c and its thickness is t . k is a constant indicating the density of fibers in any given approximate direction, i. e. the number of fibers running through the unit of cross section of any bundle of approximately parallel fibers. It follows that c^2k fibers run approximately perpendicularly through the cutting plane. These will appear as dots in the microscope.

The number of fibers in any other direction is smaller. It is proportional to the area of the projection of our slice on a plane perpendicular to the given direction, as shown in figure 14. The fibers running in that direction form the angle α with the plane of sectioning (horizontal surface of the slice). Their projections into the

plane of sectioning form the angle β with one of the vertical walls of the slice. β can vary from 0 to 2π . Yet the percentual distribution of fiber sections for $0 \leq \beta \leq 2\pi$ is the same as for $0 \leq \beta \leq \frac{\pi}{2}$. One quadrant of β , therefore, will suffice to obtain a percentage wise distribution of fiber sections.

The area of the projection of the slice on the plane perpendicular to the fiber direction is a function A of α and β , and especially

$$(1) \quad A(\alpha, \beta) = c^2 \sin \alpha + t c \cos \alpha \cos \beta + t c \cos \alpha \sin \beta, \text{ for } 0 \leq \beta \leq \frac{\pi}{2}.$$

Since in a random distribution of fibers it will be practically impossible to find a fiber forming an accurately predetermined angle with the sectional plane, we search for the expected number of fibers between two values of α . The total number of fibers can be found by integration as follows:

$$(2) \quad N = 4k \int_{\alpha_1}^{\alpha_2} \int_0^{\frac{\pi}{2}} A(\alpha, \beta) d\beta d\alpha$$

(k is multiplied by 4 in order to compensate for the limitation of range of β to one quadrant.) Specifically, then

$$(3) \quad N = 4ck \left[\frac{\pi}{2} c (\cos \alpha_1 - \cos \alpha_2) + 2t (\sin \alpha_2 - \sin \alpha_1) \right]$$

The number of fibers cut as well as the length of the projections of the fiber pieces included in the slice are dependent on α only as (3) shows. This projection length is measurable in the microscope. When, in formula (3) the projection length is substituted for the angle α according to the relation $p = t \cot \alpha$, and when the slice is 100μ long, 100μ wide and 10μ thick (corresponding to the area of an average oil immersion field of a section of conventional thickness), the following approximate percentages can be expected:

measurable length of projection of fiber	percent expected
0—10 μ	66,2%
10—20 μ	20,0%
20—30 μ	6,1%
30—40 μ	3,2%
40—50 μ	1,6%
50—60 μ	1,3%
60—70 μ	0,2%
70—80 μ	0,2%
80—90 μ	0,1%
90—100 μ	0,1%
100 μ — ∞	1,0%

In order to test the initial statement saying that the collagenous tissue which develops in certain cases of cirrhoses is laid down in the form of fibers, it will be necessary to observe what appears to be the length of the fibers cut. If, with stopped down diaphragm, more than half of their sections appear shorter than the

thickness of the slices; if about one fifth of their number appears to have a length lying between the section thickness and twice that length, if less than one-fifth of the fiber projections appear as longer lines, while only 1% of them traverse the entire field at oil immersion, we can assume that our hypothesis of the fibrous structure of the collagenous tissue in pericholangiolitis and in a few other cases of cirrhosis is correct.

Figures 3, 4, and 5 (plate 1) show examples of pericholangiolitic, collagenous fiber bundles.

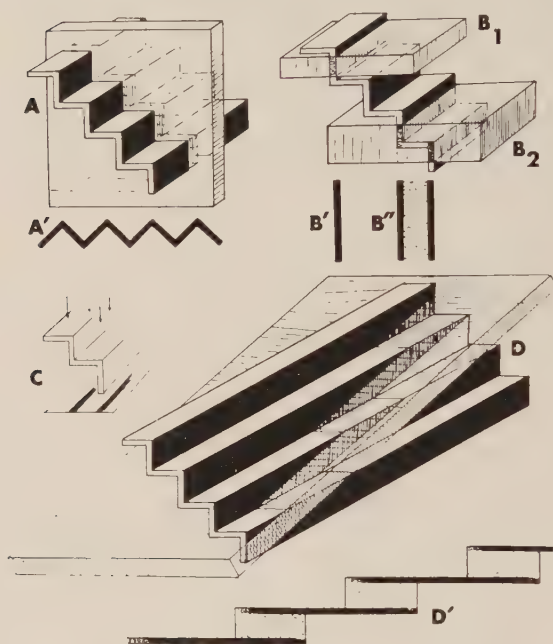


Fig. 2. Various possibilities of sectioning a stair shaped membrane

are almost parallel and their projections of approximately equal length in each of the individual photomicrographs, shown in figures 3 and 4. The areas of fibrosis, however, are too small to allow such manipulation as to produce three sections perpendicular to one another within each area. We must, therefore, depend on estimation. No one will, however, deny that in pericholangiolitic cirrhosis and in a few other cases of cirrhosis, we find some dots, many elongated dots, numerous short lines, and very few, if any, long lines which take the Van Giesson or Mallory stain. This is, it appears, sufficient evidence to accept as conclusive the theory of the fibrous nature of the greater part of the collagenous tissue in this condition.

Not all of the connective tissue, even in extremely characteristic cases, is fibrous, however. For in certain regions, very long lines are seen in the sections, a condition incompatible with the assumption of the existence of fibers. In these regions, then, the collagenous tissue must be of a different structure.

Unfortunately, measurements and counts of statistical significance of the fiber sections can hardly be made. For a statistical analysis of geometrical structures requires either random distribution and uniform density of the parts to be examined (fibers), or, if they are present in parallel arrangement, a sufficient mass to allow the production of three sections in planes perpendicular to each other, to be taken from a territory where all fibers are parallel and straight.

Neither of these conditions is fulfilled in a liver showing cirrhosis. For the fibers are found in parallel arrangement within curved trabeculae (or in advanced cases in septa). Therefore, the fiber sections

II. Collagenous Membranes

In these regions as well as in most cases in which pericholangiolitis is not a cause of cirrhosis, the collagenous tissue was found to be fundamentally different in structure. These are mostly cirrhotoses initiated by passive congestion, central necrosis, massive necrosis, periportal inflammation, and fatty degeneration.

In all these cases, the histological slides exhibit long lines of material identified by its staining properties as collagen (fig. 6; plate 1).

Short lines and dots of collagenous material are present but much less numerous than long lines. It is obvious that the structures yielding linear sections cannot be fibers if these are present in large numbers. It has been re-stated in 1951 that a plane section of an n -dimensional structure is an $(n-1)$ -dimensional structure, except in the rare case of tangential sectioning. Inversely, if a section exhibits m -dimensional structures, these indicate the presence of $(m+1)$ -dimensional structures in the sectioned material. In histological slides, most of the collagenous material in non-pericholangiolitic cirrhosis appears, as we have seen, as lines (fig. 6), i. e., 1-dimensional structures. It follows that the structures that have been sectioned are 2-dimensional. In other words, they are thin sheets or membranes.

If they are membranes, it should be possible, it was thought, to follow them through successive layers in serial sections. As observations showed, this is, in most cases, not possible.

This apparant contradiction, however, can be resolved:

As figure 6 shows, the membranes are corrugated. Since they appear corrugated at every place and in every section, it must be assumed that they are corrugated in all directions as shown schematically in figure 12. A reconstruction of a few membranes from serial, optical section (figs. 9 and 10) is shown in figure 11. The irregular waviness of these membranes in every direction is evident.

It remains to be explained why these membranes frequently seem to end abruptly and why they cannot be traced through serial sections.

At first, it should be noted that the membranes of cirrhosis are very thin and even when stained are so transparent that they cannot be seen when viewing them from their flat side. They can only be seen when observed "head on", i. e., when the visual rays are directed tangentially to the membrane, just as a folded marquissette drape (Tüllvorhang) is transparent, showing vertical lines of opacity only along those portions of the drape that are directed perpendicularly to the window glass (fig. 13). This phenomenon is illustrated schematically in figure 2, c.

Let us compare a corrugated membrane with a broad stair and see the stair's appearance in section (fig. 2, A. B. D).

Since the stair-shaped membrane is very thin ($0.2-1 \mu$), but the section is thick ($10-15 \mu$), the thickness of the section is significant. If the plane of sectioning runs perpendicular to the edges of the steps (fig. 2 A), the section of the stair is continuous, zig-zag shaped (fig. 2 A¹), and can be followed through serial sections. If the plane of sectioning runs parallel to the surfaces of the steps and between the levels of two steps, the section of the stair appears as one straight line

Plate 1

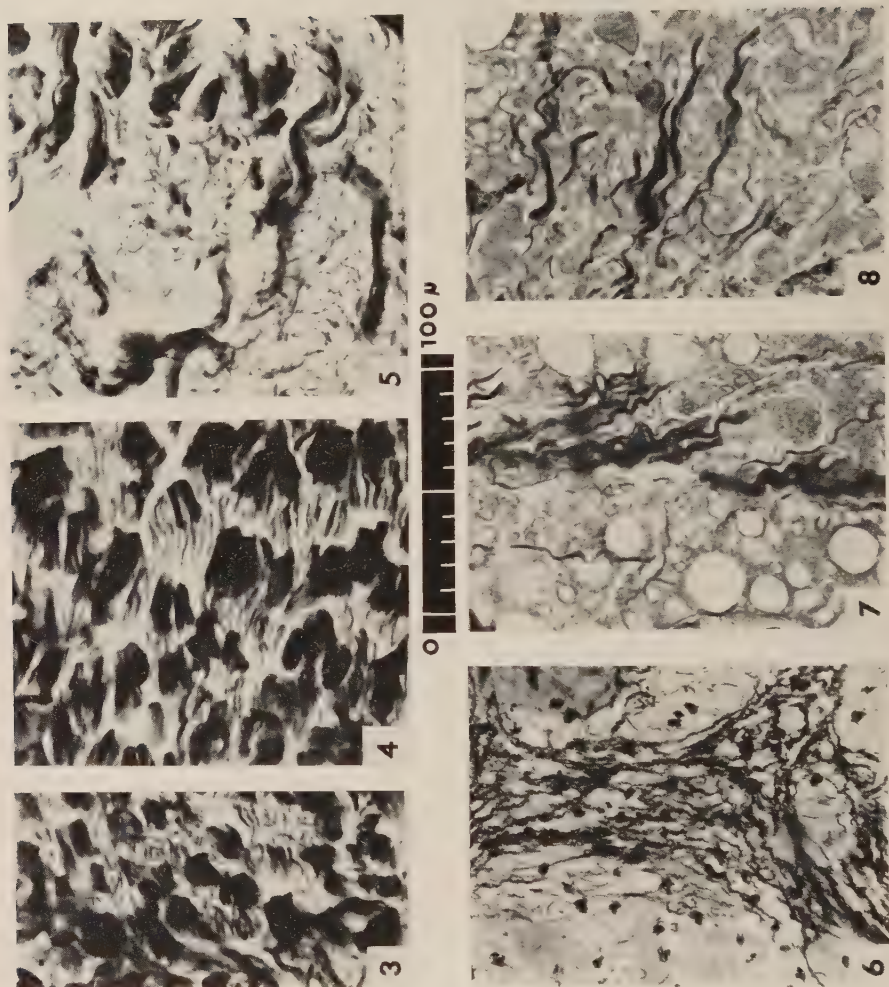


Fig. 3—5. sections of collagenous fiber bundles from a human liver in a case of advanced pericholangiolitic cirrhosis

Fig. 6—8. sections of collagenous membranes from a human liver with cirrhosis resulting from passive congestion. The scale does not apply to fig. 6 which is photographed at lower magnification

Plate 2

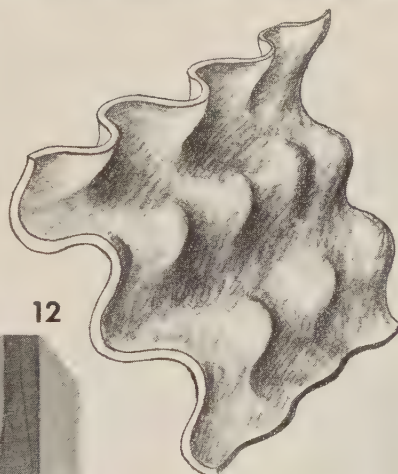
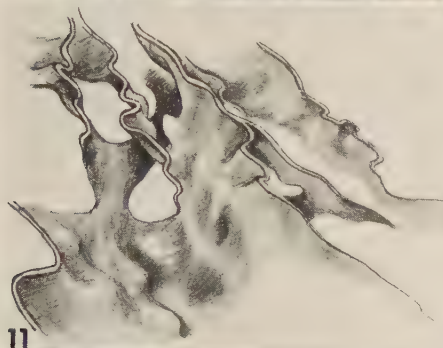
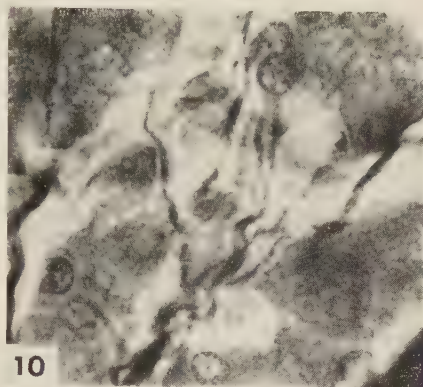
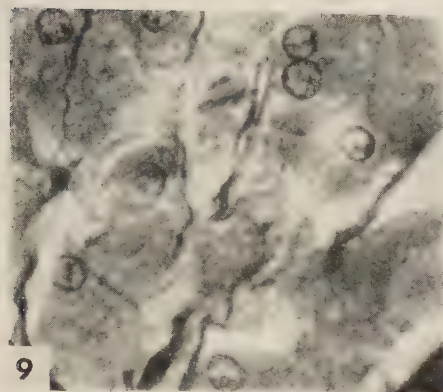


Fig. 9—10. Optical sections taken at different focal levels of the same field showing collagenous membranes (same case as shown in figs. 6—8)

Fig. 11. Reconstruction of a group of collagenous membranes produced from 9 optical sections representing a total thickness of 30μ

Fig. 12. Schematic stereogram of a corrugated membrane

Fig. 13. Photograph of a marquisette drape (Tüllvorhang)

(fig. 2 B_1 and B'); or as two parallel straight lines, if the section includes parts of two vertical toeboards (fig. 2, B_2 and B''). Obviously, when serial sections are cut, successive pieces of the stair will not be found at the same location. The two directions of cutting are, however, singular possibilities. It is more probable that the stair will be cut obliquely. Such a case is shown in figure 2 D. The appearance of the section at that particular angle of cutting is shown in figure 2 D'. The stair-like membrane appears as a series of short lines arranged at various levels. The parts of the stair which are almost parallel to the cutting plane, stippled in figure 2 C, are not or almost not visible in the microscope.

The collagenous membranes in cirrhotic livers are not exactly shaped like

stairs, but they are corrugated in all directions (fig. 11 and 12), and are irregularly bent so that images identical with those shown in figure 2 cannot be expected to be found. However, it is to be expected that somewhat similar configurations should occur. This, indeed, is the case. Figures 7 and 8 can be explained by the stair analogy.

Unfortunately, when observing single slides it is impossible to judge whether

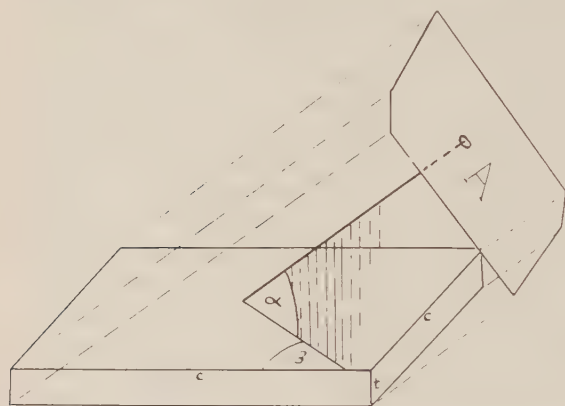


Fig. 14. Diagram illustrating the derivation of formula 1

several lines of collagen are sections of as many membranes or optical sections of one and the same membrane (figs. 2 B'' , D' and fig. 8).

To reconstruct the collagenous membranes of cirrhotic livers, one must, at high magnification, carefully focus a few sections at various levels. Thus, figure 4 is drawn from a glass plate model of nine levels obtained by focusing high, intermediate, and low three successive microtome sections, 10 μ thick.

Conclusions

The collagenous tissue in cirrhotic livers is of two types: most of it consists of true fibers in the case of pericholangiolitic cirrhosis, and in a few other isolated cases. Fibers are also present in the portal canals, in the adventitiae of the central veins, in the delicate trabeculae which accompany intralobular bile ducts, arterioles and arterial capillaries, both in normal and cirrhotic livers of every type.

However, in most non-pericholangiolitic cirrroses, true fibers are present almost exclusively at their original location. Most of the newly formed collagenous tissue is present in the form of membranes. A few membranes are also found in pericholangiolitic cirrroses and other cases in which fibers predominate.

No case of cirrhosis was observed in which the predominant type of connective tissue was present in purity. Yet one or the other type was very conspicuously predominant in every case.

The term fibrosis, commonly used for proliferation of connective tissue is, therefore, a misnomer. For this reason it is proposed to designate as "syndesmosis" proliferation of connective tissue in general (σύνδισμος connective tissue); to call the fibrous type of connective tissue proliferation "rhammosis" (ράμμα = thread); and to give the name of "membranosis" to the deposition of collagenous membranes (μεμβράνα parchment, New Testament Greek, but understandable).

The better term „ionsis“ (from ἴς, ἰνός fiber) is unfortunately already used for coagulation of fibrin.

[Eingegangen am 12. August 1952]

Kleine Original-Mitteilungen

Krauter, Dieter, (Stuttgart), C-Lack in der mikroskopischen Technik.
Eingegangen am 30. VII. 1952.

Die Firma Bayer, Leverkusen, bringt in nächster Zeit einen Lack in den Handel, der sich in der Mikroskopie vielseitig verwenden läßt.

Zum Gebrauch wird der „C-Lack“ je nach der gewünschten Konsistenz mit Azeton verdünnt.

1. Herstellung von Kurspräparaten. Mikrotomschnitte werden mit Eiweiß-Glycerin auf Objektträger oder größere Glasplatten aufgeklebt, in üblicher Weise entparaffiniert, durch die Alkoholstufen gebracht, gefärbt und wie gewöhnlich entwässert. Nach völliger Entwässerung werden die Objektträger mit den aufgeklebten Schnitten dem abs. Alkohol¹⁾ entnommen, die Schnitte durch kurzes Aufpressen von Filtrierpapier oder Zellstoffwatte oberflächlich abgetrocknet und mit C-Lack übergossen. Die Schnitte sollen dabei soweit abgetrocknet werden, daß sie gerade noch feucht sind. Völliges Austrocknen ist natürlich zu vermeiden.

Die mit C-Lack übergossenen Objektträger läßt man staubgeschützt an der Luft trocknen. Zuweilen treten beim Trocknen Trübungen auf, die aber nach gelindem Erwärmen wieder verschwinden.

Ist nach einigen Stunden der aufgebrauchte Lack zu einem Film eingetrocknet, so werden die Objektträger in Wasser eingelegt. Schon nach wenigen Minuten lassen sich die Filme samt den jetzt in sie eingeschlossenen Schnitten mühelos ablösen. Sie werden unter Auflage einer Glasplatte zwischen Filtrierpapier getrocknet und — können sie nicht gleich verarbeitet werden — in Briefumschlägen aufbewahrt.

Zur Herstellung der Präparate werden die einzelnen Schnitte abgetrennt und samt dem sie umschließenden Lack in Caedax, Kanadabalsam oder dgl. eingedeckt. Damit sich die Schnitte nicht wellen, empfiehlt es sich, auf den Objektträger zuerst einen kleinen Tropfen Xylol zu bringen, darin das Filmstückchen mit dem eingeschlossenen Schnitt einzulegen und dann erst einen Tropfen des Einschußharzes aufzubringen.

Geringe, durch die C-Lack-Methode bedingte Gewebeschrumpfungen konnte der Verfasser nur dann feststellen, wenn der Film durch zu starke Verdünnung des Lackes mit Azeton zu dünn geraten war.

Sollen die Schnitte von den Kursteilnehmern selbst gefärbt werden, so empfiehlt sich das folgende Verfahren:

Entparaffinieren der aufgeklebten Schnitte, Einstellen in abs. Alkohol, Abtrocknen, Übergießen mit C-Lack, Ablösen des getrockneten Lackfilmes in Wasser und Trocknen zwischen Filtrierpapier wie oben beschrieben. Da sich C-Lack mit den gebräuchlichen Farbstoffen nicht anfärbt, können die in den Lack eingeschlossenen Schnitte wie gewöhnlich gefärbt werden. Die Färbezeiten müssen allerdings etwas verlängert werden. Entwässern der gefärbten Schnitte mit Alkohol ist überflüssig; in C-Lack eingeschlossene Schnitte können zwischen Filtrierpapier an der Luft getrocknet und direkt in Balsam eingedeckt werden.

ZACH (4) bringt ungefärbte, in C-Lack eingeschlossene Schnitte vor der Färbung zur Verdrängung der Luft kurz in Alkohol und erreicht damit eine noch gleichmäßigere und schnellere Färbung.

¹⁾ Die beschriebenen Versuche wurden mit abs. Isopropylalkohol durchgeführt.

Für die Behandlung dicker, nicht entparaffinierter Schnitte mit C-Lack hat die Sero-bakteriologische Abt. der Farbenfabriken Bayer dem Verfasser freundlicherweise das folgende Verfahren angegeben:

Objektträger ganz dünn mit Glyzerin einreiben. Auf dieser Schicht die Schnitte mit Wasser strecken, trocknen lassen, Isopropylalkohol auftropfen, abtupfen, mit C-Lack übergießen.

2. Behandlung von zerbrochenen Präparaten. Ablösen des Deckglases in Xylol, Einlegen in abs. Isopropylalkohol, Abtupfen des Schnittes, Auftropfen von C-Lack. Weitere Behandlung wie oben beschrieben.

3. Präparation von Hand- und Gefrierschnitten. Lose Schnitte werden bekanntlich leicht verletzt und gehen in Farblösungen oft verloren. Zum Einschluß in C-Lack werden die Schnitte aus Wasser oder Alkohol auf Objektträger gebracht, mit Filtrierpapier soweit abgetrocknet, daß sie gerade noch feucht sind, durch mehrmaliges Auftropfen von Azeton entwässert und mit C-Lack übergossen. Nach Ablösen des Filmes in Wasser können die in ihn eingeschlossenen Schnitte beliebig weiterbehandelt werden.

4. Behandlung von botanischem Material mit Eau de Javelle. In C-Lack eingeschlossene Schnitte können mit Eau de Javelle gebleicht werden, ohne — wie lose Schnitte — bei längerer Einwirkung auseinanderzubröckeln.

5. Schneiden von zu harten und bröseligen Paraffinblöcken. ZACH (4) gibt folgende, sehr brauchbare Methode an:

Schnittfläche mit C-Lack bepinseln, nach einer Minute schneiden. Der Schnitt kann aufgeklebt oder wie ein Celloidinschnitt behandelt werden. (Nach den Erfahrungen des Verfassers lassen sich solchermaßen vorbehandelte Schnitte nur unsicher aufkleben. Besser ist es, sie in der Art von Celloidinschnitten zu verarbeiten).

Ähnlich wie C-Lack werden der schweizerische Zyklonlack (3) und der „Sprimoloidlack für histologische Zwecke“ (s. ROMEIS § 552a) verwendet.

Die Sero-bakteriologische Abteilung der Firma Bayer, Leverkusen, hat zur Durchführung der Versuche mit C-Lack in entgegenkommender Weise Probenmengen zur Verfügung gestellt.

Schrifttum

- 1) KRAUTER, D.: C-Lack — ein neues Hilfsmittel in der Mikroskopie. Mikrokosmos **41**, 215 (1952).
- 2) ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948.
- 3) TOMASCH, J.: Die Anwendung von Zyklonlack in der histologischen Technik. Mikrokosmos **41**, 168 (1952).
- 4) ZACH, O.: Erfahrungen mit C-Lack. Mikrokosmos **41**, 290 (1952).

Jesben-Marwedel, Hans, (Gelsenkirchen), Sinnvolle Abgrenzung von „Mikro- und Makrophotographie. — Eingegangen am 3. IX. 1952.

Wer sich viel mit der photographischen Wiedergabe kleinerer Objekte in Maßstäben über 1 : 1 befaßt, begegnet der störenden Tatsache, daß keine Einhelligkeit darüber besteht, unter welchen Umständen eine Aufnahme „noch“ als makroskopisch und von wann ab sie „schon“ als mikroskopisch anzusprechen ist. Diese Tatsache führt erfahrungsgemäß zuweilen zu Mißverständnissen. Es läßt sich nachweisen, daß gelegentlich noch 10fache Vergrößerungen unter ausdrücklicher Distanzierung von der Mikrophototechnik als „Übersichtsaufnahmen“ — also als makroskopisch gelten. Andererseits sollten photographische Wiedergaben mit nur 5- oder 8facher Vergrößerung, die unter Zuhilfenahme besonderer optischer Mittel (z. B. einer Camera mit Mikroobjektiv, wenn auch ohne Anwendung eines Mikroskops) entstanden, die Bezeichnung „mikroskopisch“ unter allen Umständen bean-

spruchen dürfen. Die Vergrößerungsmaßstäbe allein sind also sicher kein Unterscheidungsmerkmal. Denn sie überschneiden sich u. U. beträchtlich.

Folgende Einteilungen wären möglich:

1. Man nennt grundsätzlich alle Aufnahmen über $M = 1:1$ mikroskopisch.
 Vorteil: Einfachheit des Prinzips.
 Nachteil: a) Schwere Unterscheidbarkeit nach Einzelheiten des Bildes;
 b) das Auge empfindet Bilder von etwa $M = 1:1,2$ oder $1,5$ dem Charakter nach noch nicht als mikroskopisch;
 c) es würden Nachvergrößerungen von $1:1$ -Negativen auch unter Mikroaufnahmen fallen.
2. Man erklärt grundsätzlich alle Aufnahmen, die unter Anwendung wenn auch nur schwach vergrößernder Aufnahmeoptik entstanden sind, als mikroskopisch.
 Vorteil: Leicht kontrollierbar.
 Nachteil: Ohne qualitative Kennzeichnung.
3. Man betrachtet alle Aufnahmen, auch solche ohne Mikroskop, die unter Anwendung einer ausdrücklichen „Mikrooptik“ zustandekamen, als mikroskopisch.
 Vorteil: Unzweifelhafte Voraussetzungen.
 Nachteil: Nicht jedes vergrößernde Objektiv gilt als ausgesprochenes Mikroobjektiv.
4. Man läßt sich von der Bildauflösung leiten; nicht der Vergrößerungsmaßstab entscheidet, sondern der Auflösungsgrad.
 Vorteil: Schwer kontrollierbar.
 Nachteil: Auch noch relativ schwache Vergrößerungen fallen damit unter Mikrophotographie.

Das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges beträgt sowohl von der anatomischen Seite her (durch den Abstand der Zäpfchen auf der Netzhaut) als auch von der physikalischen Seite her (durch die Anordnung der Pupille) etwa eine Bogenminute, wie sich rechnerisch überschlagen läßt und auch von ärztlicher Seite anerkannt wird. Es verfügt äußerstenfalls über eine Wahrnehmbarkeit von 1_{10} Dioptrien. Seine Leistung ist also schon von einer Aufnahmetechnik leicht zu übertreffen, die sich nur wenig vergrößernder Optiken bedient.

Solche Aufnahmen, die also der menschlichen Wahrnehmung mehr Einzelheiten erschließen, als das normale Sehvermögen vermag, verdienen, d. h. dürfen für sich in Anspruch nehmen, Mikroaufnahmen zu sein, d. h. also ganz bewußt auch solche, die nur die Wirkung einer Lupe wiedergeben.

Hiernach ist es ohne weiteres verständlich, daß die reine Vergrößerungsangabe bei einer Photographie für die wissenschaftliche Auswertung in vielen Fällen wertlos ist. Um so mehr sollte der Brauch gewissenhaft eingehalten oder immer wieder als notwendig empfohlen werden, nicht nur die Vergrößerung, sondern auch alle kennzeichnenden Daten des Objektivs anzugeben. Nur sie geben dem Betrachter ein Bild von der erzielten Auflösung. Die alleinige Bezeichnung eines Bildes als Mikrophotographie mit dem Maßstab $1:x$ wird damit sinngemäß einer qualitativen Bedeutung enthoben und damit nur noch zu einem rein quantitativ orientierenden Merkmal, was sie auch nicht anders verdient.

Man sieht also, es gibt zu viel Gesichtspunkte, die sich gegenseitig im Wege stehen. Man sollte also denjenigen herausgreifen, der sich am sinnvollsten der Vorstellung einer Mikrophotographie anpaßt, und zu diesem Zwecke die Eigenschaft des menschlichen Auges zugrunde legen. Es ist in Übereinstimmung mit der Erfahrung und in Anlehnung an die praktische Handhabung erfahrener Kreise zu empfehlen, grundsätzlich jedes Bild als mikrophotographisch zu bezeichnen, dessen

darstellung das Auflösungsvermögen des normalen menschlichen Auges übersteigt. Auch diese Grenze ist nicht scharf, aber bei gewissenhafter Handhabung nicht einzuhalten.

In diesem Sinne wäre z. B. auch die Aufnahme einer Goldschmiedearbeit, welche Einzelheiten der Oberflächenbearbeitung und damit ein Urteil über die Qualität der handwerklichen Leistung zu gewinnen erlaubt, absolut als Mikroaufnahme zu betrachten.

Raumann, Walther. (Göttingen, Anatom. Institut, Direktor Prof. E. Blechschmidt). — Zur Standardisierung des Schiffschens Reagens. — Eingegangen am 17. Sept. 1952.

Angesichts der Vielfalt von Vorschriften, welche für die Herstellung des SCHIFFschen Reagens (Leukofuchsin) zu histologischen und histochemischen Zwecken angegeben worden sind, erscheint es zweckmäßig, eine Standardisierung anzustreben. Denn nur mit einem genormten Carbonylreagens werden sich vergleichbare Ergebnisse mit Methoden erzielen lassen, bei denen es auf eine Identifizierung von vorgegebenen oder histochemisch erzeugten Carbonylgruppen ankommt (FEULGENTechnik, Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion u. a.).

Eine wesentliche Vereinfachung der Zubereitung des Reagens brachte die von LILLIE (1951) mitgeteilte Methode, die den Ansatz ohne Erhitzen und ohne das mit variablen Substanzverlusten einhergehende Filtrieren der Fuchsinlösung durchführt. Leider kommt es in diesem Präparat nach einiger Zeit zum Ausfallen von Leukofuchsininkristallen. Aus diesem und anderen Gründen hat nun inzwischen LONGLEY (1952) auf der Basis der LILLIESchen Kaltmethode die wesentlichen Faktoren des SCHIFFschen Reagens hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Aktivität der Ansätze durchgeprüft. Dies sind die wichtigsten Ergebnisse: Der SO_2 -Gehalt oberhalb einer gewissen Minimalkonzentration, die für die Überführung von Fuchsin in Leukofuchsin erforderlich ist, ohne Bedeutung. Die Farbstoffkonzentration muß oberhalb 0,125% liegen und soll 0,5% nicht überschreiten, da es sonst nicht zur Präzipitation kommt. Aus dem gleichen Grunde muß das pH unter drei liegen. Erwärmen beim anfänglichen Lösen der Farbbase erhöht die Präzipitationsneigung. Eine völlige Entfärbung des Reagens ist bei Verwendung zu histochemischen Zwecken unbedingt erforderlich, da die gelb bis orange gefärbten Restkörper undefinierter Natur, welche in den meisten Vorschriften toleriert werden, die Versuchsergebnisse wesentlich zu verändern vermögen.

LONGLEY hat auf Grund dieser Ergebnisse eine neue Vorschrift für die Herstellung des SCHIFFschen Reagens angegeben. Ich schlage nun vor, dieses experimentell begründete Verfahren durch Verwendung von Pararosanilin (BAYER-Labor-Blatt 2/3, 1951) weiter zu verbessern. Basisches Fuchsin, welches üblicherweise Anwendung findet, ist ein Gemisch aus Parafuchsin und seiner Methylverbindung und außerdem meist durch Acridinverbindungen verunreinigt. Die als Pararosanilin acridinfrei stand. Bayer“ in den Handel kommende Farbbase des Parafuchsin ist eine einheitliche Verbindung. Die LONGLEYSche Vorschrift muß bei Verwendung von Pararosanilin wegen dessen geringer Wasserlöslichkeit etwas modifiziert werden. Ich schlage daher folgendes Verfahren als Standardtechnik der Herstellung des SCHIFFschen Reagens vor:

1. 0,5 g Pararosanilin werden in 15 ccm n-HCl ohne Erwärmen unter Schütteln vollständig gelöst.
2. Zusatz einer Lösung von 0,5 g Kaliummetabisulfit ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) in 85 ccm Aq. dest.

3. Die klare, kräftig rote Lösung hellt sich allmählich auf und wird dabei gelblich. Sie wird nach 24 Std. mit 300 mg Aktivkohle (pulv.) 2 Min. lang geschüttelt¹⁾.
4. Das völlig farblose Filtrat ist sofort gebrauchsfertig und in Schliffstopfenflasche mehrere Monate haltbar.

Schrifttum

- 1) BAYER-Labor-Blatt 2/3, 1951. — 2) LILLIE, R. D.: Stain Techn. **26**, 163 (1951). — 3) LONGLEY, J. B.: Stain Techn. **27**, 161 (1952).

¹⁾ Ein Absorbieren der gelblichen Verbindungen aus der noch roten Lösung ist unzweckmäßig, da Aktivkohle nach LONGLEY zu Fuchsin eine wesentlich stärkere Affinität besitzt als zu seiner Leukoverbindung und daher ein stärkerer Aktivitätsverlust zu erwarten wäre.

Referate

Ödöding, H., Die Wuchsstofflehre, Ergebnisse und Probleme der Wuchsstoff-Forschung V. XII, 305 S., 76 Abb. Stuttgart (G. Thieme) 1952. Preis: Ganzleinen DM 33,—.

Die Lehre von den Wuchsstoffen der Pflanzen und ihren Wirkungen auf die wuchsstoffproduzierenden und fremde Organismen hat durch die Forschungen der letzten Jahre einen außerordentlichen Umfang gewonnen und dabei mit sovielen Disziplinen der Botanik, mit sovielen Fragen der Zytologie und Histiologie, der Ernährungs- und der Reizphysiologie, der Polaritätsforschung und der Wachstumsphysiologie, der Entwicklungsgeschichte und Entwicklungsmechanik, der Gallenlehre usw. so enge Beziehungen gewonnen, daß ihr von allen Seiten immer neues Interesse zugewandt wird. Ein Buch, das der großen Mannigfaltigkeit und Fragenfülle der Wuchsstoff-Forschung so gut gerecht zu werden vermag wie das vorliegende Werk, wird daher von den verschiedensten Arbeitsgebieten her mit lebhaftem Interesse begrüßt werden. Die Darstellung des dem Verf. seit Jahrzehnten wohlvertrauten Stoffes ist vortrefflich; die Lektüre seines Buches ermüdet nirgends.

Küster (Gießen)

Weber, E., Physiologische Untersuchungen an *Euglena olivacea* (Sitz.-Ber. Österr. Akad. d. Wiss., Math.-Naturw. Kl. Abt. I, Bd. 160, H. 6/7, S. 615—638).

Auf fettfreiem Objektträger trägt man einen dünnen Film Eiweißglyzerin auf, hiernach einen die Zellen enthaltenden Tropfen, dazu das Fixiermittel. Nun läßt man den Tropfen sich ausbreiten, bis die Zellen die Wasseroberfläche aufheben. Betrachtung des Objektträgers schräg zum Lichte gehalten gibt hierüber Klarheit. Dann Übersättigung der Zellen mit dünner Lösung Zelloidin; den Äther läßt man etwa $\frac{1}{2}$ Min.) ein wenig verdunsten; hiernach bringt man die Zellen zur Härtung in 70%igen Alkohol, wobei auch das Fixiermittel entfernt wird. Schließlich Färbung.

Küster (Gießen)

Liegenspeck, H., Vorkommen und Bedeutung von Endodermen und Endodermoiden bei oberirdischen Organen der Phanerogamen im Lichte der Fluoroskopie (Mikroskopie Bd. 7, H. 5/6, 1952, S. 202 bis 208).

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Sperrwirkung der Endodermen (mit CASPARYschen Streifen) und der Endodermoide (endodermisähnliche Scheiden, deren Zellwände CASPARYsche Streifen vermissen lassen, in späteren Stadien ihrer Entwicklung aber Suberinlamellen auflagern können). Die vom Verf. angewandten Fluorochrome wandern in den Zellwänden. Am besten bewährten sich bei seinen Färberversuchen Oxypyrengeilb und Dioxypyrenbraun, ferner Akridinorange; — letzteres vermag im Gegensatz zu den erstgenannten bei länger währenden Versuchen zumal mit seiner undissoziierten Phase auch durch das Protoplasma zu wandern, freilich so langsam, daß bei kurzer Versuchsdauer keine Störung der Membranen geltenden Beobachtungen zu fürchten ist. Die Fluorochrome wurden den Versuchspflanzen als Lösungen 1:1000 geboten. — Allzu intensive Beleuchtung der Objekte ist zu vermeiden, da durch photodynamische Wirkungen die Protoplasten der Zellen geschädigt werden und eine Leitung der Farbstoffe im Lumen veranlaßt werden könnte.

Zur Beobachtung seiner Objekte bediente sich Verf. besonderer Okulare, in die ein Polarisationsnikol und ein Sperrfilter oder Gelbscheibe eingebaut waren; auch Filter aus Polarisationsfolien wurden mit Erfolg verwendet.

Küster (Gießen)

Kisser, J., u. Skuhra, H., Zur Methodik der Kutikularanalyse rezenter Pflanzen (Mikroskopie Bd. 7 H. 5/6, 1952, S. 164—173).

Die Verf. prüfen zahlreiche Methoden, die zur Isolierung der Kutikula-Lamellen geeignet scheinen.

Das SCHULZE'sche Gemisch ($\text{KClO}_3 + \text{HNO}_3$ — nach Vodrážka) bewährt sich im allgemeinen gut (Zimmertemperatur, Nachbehandlung mit verdünntem Ammoniak); bei sehr dünnen Kutikularhäutchen ist Verdünnung mit Wasser zu empfehlen (3:1—1:1). — HOFFMEISTERS Reagens ($\text{KClO}_3 + \text{HCl}$ — nach Vodrážka) gibt auch bei längeren Einwirkungszeiten nur unsichere Resultate — Kaliumpermanganat (in Wasser oder in Säuren, Schwefel-, Salz- oder Salpetersäure gelöst) ist unbrauchbar. — Eau de Javelle gibt auch bei sehr zarten Lamellen vortreffliche Resultate, allerdings erst nach langen Einwirkungszeiten; Nachbehandlung mit Salzsäure (5%). — Wasserstoffsuperoxyd (30%) mit Zusatz von konz. Ammoniak (2:1) isoliert die Häute sehr schnell, läßt sie aber infolge der stürmischen Sauerstoffentwicklung in kleine Stücke zerfallen. Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure hat sich nicht bewährt; Mischung von Wasserstoffsuperoxyd und Eisessig (2:1) gab bei 60—70° im allgemeinen recht brauchbare Resultate; noch bessere erzielte der Verf. nach Zusatz von rauchender Salpetersäure — man verdünne diese bei zarten Objekten mit Wasser 1:1, bei derberen 2:1 und gebe zu 10 ccm der verdünnten Säure 1 ccm der 30%igen Wasserstoffsuperoxydlösung; kurze Nachbehandlung mit konz. rauchender Salpetersäure. Selbst sehr zarte Objekte liefern nach 2—6 Std. intakte Kutikulahäute. — Am besten bewährte sich nach den Erfahrungen der Verf. Chrom-Salpetersäure; gesättigte Lösung von Chromsäure wird in konz. Salpetersäure gelöst; die Lösung ist für derbe Gewebe 2:1, für zarte 1:1 mit Wasser zu verdünnen. Bei Zimmertemperatur gewinnt man schon in wenigen Stunden gute Präparate.

Küster (Gießen)

Krebs, J., Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplastens. I. Osmotische Werte. II. Plastidenkonsistenz (Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. d. Wiss., Math.-Naturw. Kl., Abt. I, Bd. 160, H. 6/7, S. 579—618 mit 3 Text-Abb.).

Verf. wiederholte an ihren Objekten, insbes. Euastrum die Kupferversuche WEBERS. Verdünnte Kupfersulfatlösung führt wie bei Spirogyra auch bei Euastrum zur Versteifung der Plastiden. Die Konzentrationsschwelle, bei der nach kurzfristiger Behandlung diese Reaktion eben noch eintrat, wurde mit 0,00001 mol Kupfersulfat bestimmt; doch wirken auch niedrigere Konzentrationen (0,000001 mol Kupfersulfat) nachträglich irreversibel schädigend.

Küster (Gießen)

Höfler, K., Ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Verbreitung von Anthochloren in gelben Blüten (Anz. Math.-Naturw. Kl. Österr. Akad. d. Wiss. Wien 1951, Nr. 14, S. 366—369).

Vor dem glimmenden Ende einer Zigarre schlägt der gelbe Ton der Blumenblätter von Coreopsis u. a. in bleibende rote Färbung an den vom Rauch bestrichenen Stellen um; es handelt sich um dieselben Anthochlore, die in Lösung mit Alkalien sich intensiv und lange Zeit beständig blutrot oder kirschrot färben. Korollen, welche Karotine enthalten (Helianthus usw.), erfahren keine Verfärbung. Gelb blühende Papaverarten und manche Dahlia-Rassen erfahren eine orange oder dunkelgelbe, verschiedene Verbascum-Arten eine grünliche bis grünbraune Verfärbung.

Küster (Gießen)

arsen, P., & Sin Min Tung, Growth-promoting and growth-retarding substances in pollen from diploid and triploid Apple varieties (Bot. Gaz. vol. **111**, Nr. 4, 1950, S. 436—447).

Bei der Untersuchung der Pollenkeimung bewährte sich dem Verf. eine Lösung, die im Liter folgende Stoffe enthielt:

Ca(NO ₃) ₂	35 mg	H ₃ BO ₃	7 mg
KCl	8 mg	KH ₂ PO ₄	3,5 mg
MgSO ₄ + 7 H ₂ O . .	8 mg		
Eisentartrat	0,8 mg	MnCl ₂ + 4 H ₂ O . .	0,07 mg
Apfelsäure	0,7 mg	CuSO ₄ + 5 H ₂ O . .	0,008 mg
		ZnSO ₄ + 7 H ₂ O . .	0,008 mg
		Küster (Gießen)	

Seitler, L., Kopulation und Formwechsel von *Eunotia arcus* (Österr. Bot. Ztschr. Bd. **98**, H. 3, 1951, S. 292—337 m. 14 Text-Abb.).

Um die Plastiden, Nukleolen und die Wand des Kopulationsschlauches mitzufärben, empfiehlt sich Färbung mit EHRLICHs Hämatoxylin und Einbettung in Euparal (oder zur Untersuchung des Schalenbaues in StyraX). Fixierung mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN bewirkt starke Schrumpfungen, liefert aber nach Behandlung mit EHRLICHs Hämatoxylin oft distinktere Bilder. Die Kopulationsgallert, die sich im Gegensatz zur Wand des Kopulationsschlauches weder mit den üblichen Schleimfarbstoffen noch mit EHRLICHs Hämatoxylin anfärbt, färbt sich mit Mucikarmin (am besten halb mit dest. Wasser verdünnt und auf das betreffende Material angewandt).

Küster (Gießen)

Seitler, L., Der Bau des Zellkerns von *Navicula radiosa* und verwandten Arten und die präanaphasische Trennung von Tochterzentromeren (Österr. Bot. Ztschr. Bd. **98**, H. 1/2, 1951, S. 206—214).

Nach Fixierung mit Alkohol-Eisessig und Färbung mit Essigkarmin werden einige sehr schwach gefärbte Chromonemastücke oder Querschnitte von solchen und 2 oder 3 stark färbbare Körnchen von Chromozentrenhabitus sichtbar; andere Fixiermittel (außer Osmiumsäuredampf) verursachen gerinselartige Färbungen, an denen auch der Kernsaft beteiligt ist; sie verlaufen mehr oder weniger radial und zeigen vielfach Anastomosen; es handelt sich um Kunstprodukte, die von Chromonemen und kleinen Chromozentren an solchen Präparaten nicht zu unterscheiden sind.

Küster (Gießen)

Vulff, H. D., Zytologische Beobachtungen an Rosenbastarden (*R. canina* L. + *R. coriifolia* FRIES var. *Fröebeli* REHD. und *R. coriifolia* FRIES var. *Fröebeli* REHD. + *R. multiflora* THUNBERG) (Züchter Bd. **22**, H. 7/8, 1952, S. 233—244).

Blütenknospen wurden nach CARONY, Wurzelspitzen nach NAWASCHIN fixiert; Paraffin; Färbung mit Hämatoxylin. FEULGENs Reaktion erwies sich nicht als anwendbar — vermutlich wegen des reichen Gerbstoffgehaltes der Zellen (HUREL-PY, MILOVIDOFF).

Küster (Gießen)

Luber, B., Mikroskopische Untersuchung von Hölzern (Mikroskopie der Technik Bd. **5**, 1^a), S. 81—192).

In der ausführlichen Arbeit des Verf. wird der mikrotechnischen Methoden an vielen Stellen gedacht.

¹) Vgl. diese Zeitschrift Bd. 61, S. 50.

Die alten Verfahren der Holzfärbung (basisch Fuchsin-Pikrinsäure und Safranin Gentianaviolett) haben sich auch dem Verf. gut bewährt. — Zur Mazeration des Holzes bediente sich Verf. des SCHULZESchen Mazerationsgemisches: 60%ige Salpetersäure und eine der Holzmasse ungefähr entsprechende Volummenge Kaliumchlorat werden auf das Holzmaterial (Längsschnitte) geschüttet und über einer Sparflamme vorsichtig erwärmt, bis lebhafte Gasblasenentwicklung eintritt; nach einigen Minuten der Abkühlung kocht man einige Male mit Wasser, dann in Alkohol, schließlich wieder mit Wasser das Material aus. Man vermeide eine zu lange Einwirkung, damit nicht außer den Mittellamellen auch die Zellulosewände angegriffen werden. —

Bei Längenmessung der Leitbündelelemente wird von Botanikern (an Stelle der Messung von Zellenende zu Ende) die Länge der Zellenachse bevorzugt, d. h. von Mitte zu Mitte der zugeschragten Enden. Diese Messungsweise empfiehlt sich namentlich bei Angaben über die Länge der Gefäße und Siebröhrenglieder, weil mit ihr zum Ausdruck gebracht werden soll, wieviel Querwandhindernisse in jedem Zentimeter zu durchsetzen sind.

Im schwedischen Holzforschungs-Institut hat PAUL LANGE ein neues Verfahren zur Ermittlung der Lokalisierung des Lignins innerhalb der verholzten Zellenwände ausgearbeitet: ein Spektral-Apparat belichtet das mikroskopische Präparat nacheinander mit den verschiedensten Wellenlängen; die Bilder werden photographisch objektiv festgehalten. Je nach der Durchlässigkeit für die betreffende Wellenlänge erscheinen dann die verschiedenen Lagen der Zellwände heller oder dunkler. Wenn man diese Helligkeitswerte ausphotometriert, erhält man ein Adsorptionsspektrum, das Lignin und Zellulose streng örtlich zu identifizieren gestattet. Auch in nicht sichtbar geschichteten Membranen ließ sich auf diesem Wege ein rhythmischer Wechsel im Lignin-Zellulose-Verhältnis nachweisen, der vielleicht als Tagesrhythmus aufgefaßt werden darf.

Küster (Gießen)

Höfler, K., Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran (Ber. d. D. Bot. Ges. Bd. 65, H. 6, 1952, S. 183—187 mit 1 Abb. im Text).

Zunächst für die Blattzellen der foliosen Lebermoose, hiernach auch für Diatomeen und die Epidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* konnte Verf. zeigen, daß die Tonoplasten andere Permeabilitätsverhältnisse aufweisen können, als das sie umgebende Protoplasma: undissoziierte basische Farben permeieren das lebende Plasma sehr leicht, während dissoziierte Farbionen hierzu nicht befähigt sind; die Farbmoleküle sind lipoidlöslich, die Ionen lipoidunlöslich und mit ihren Wanderungen daher an den „Wasserweg“ gebunden, sie permeieren das intakte Plasma nicht. In geschädigten Zellen überdauern die Tonoplasten. Behandelt man die Zellen (*Calypogeia* usw.) mit Toluidinblau ($p_H \approx 6$), so bleibt eine Färbung des Zellinhaltes aus, da der Farbstoff bei dieser CH-Stufe gänzlich dissoziiert und seine Kationen das Plasma nicht permeieren können; die Zellsäfte geschädigter, im „Tonoplastenstadium“ befindlicher Zellen erscheinen aber gefärbt, da die Tonoplasten die Farbstoffkationen permeieren lassen.

Küster (Gießen)

aus dem patholog. Institut der Universität Bern: (Direktor: Prof. Dr. med. B. WALTHARD)
und dem Röntgeninstitut der Universität und des Inselspitals Bern
(Direktor: Prof. Dr. med. A. ZUPPINGER)

Der hyaline Knorpel im elektronenmikroskopischen Bild

Von G. Zbinden

Mit 6 Abbildungen

Bei der Erforschung des Aufbaus tierischer und menschlicher Gewebe mit Hilfe des Elektronenmikroskops (E.-M.) nimmt das kollagene Bindegewebe eine Sonderstellung ein. Die von BEAR (1942) (1) röntgenoptisch nachgewiesene Periodizität im Feinbau der kollagenen Faser konnte durch SCHMITT und Mitarb. (1942) (2) und WOLPERS (1943) (3) in der Form einer regelmäßigen Querstreifung im e.-m. Bild sichtbar gemacht werden. Fixation der Fasern mit Osmium, „Färbung“ mit Phosphorwolframsäure (GROSS und SCHMITT 1948) (4, 5) und Uranylacetat (NUTTING und BORASKY 1948) (6) und Beschattung mit Schwermetallen ermöglichten die Abbildung feinsten Einzelheiten. Das kollagene Bindegewebe aller Wirbeltiere ist einheitlich zusammengesetzt aus Fasern von 200–2500 Å Breite. Die bis zur Grenze des Auflösungsvermögens des E.-M. vorgetriebene Analyse der Querstreifung ergab eine Unterteilung der zuerst festgestellten Makroperiode von etwa 640 Å in 5–8 feinere, genau lokalisierbare Streifen, wobei jeder Streifen einer scharf begrenzten Dickenzunahme entspricht (GROSS und SCHMITT, NUTTING und BORASKY 1948) (4, 6).

Technik: Zur möglichst schonenden Präparation wird frisches oder fixiertes Material, das kollagene Fasern enthält, Haut, Sehnen, Hornhaut usw. im Wasser, evtl. unter Zuhilfenahme von Ultraschall (WOLPERS) (3) zerzupft oder auch durch Eintauchen in flüssige Luft und Anwendung rotierender Messer fragmentiert (NECKEL) (17). Behandlung mit Trysin, Hyaluronidase und KCl zerstört das den Fasern anhaftende Eiweiß und befreit sie aus ihrem Verband oder aus Organen (GROSS und SCHMITT, PORTER und VANAMEE, PRATT und WYCKOFF) (4, 7, 8). Fasern finden sich ferner extrazellulär in Explantaten bestimmter Zellen (PORTER und VANAMEE) (7) und lassen sich in vitro durch Präzipitation des in verdünnter Essigsäure gelösten Kollagens darstellen (SCHMITT und Mitarb., VANAMEE und PORTER) (2, 9). Aus hyalinem Knorpel isolierte WOLPERS (1944) (2) Fasern vom beschriebenen Bau.

Da es uns weniger um die Darstellung der Einzelfasern, als um den Bau der Zelle und des Knorpelgewebes ging, verwendeten wir bei unseren Untersuchungen das Schnittpräparat. Elektronenmikroskopische Abbildungen von Knorpelschnitten sind in der uns bekannten Literatur nicht veröffentlicht. Die

Schwierigkeit besteht gegenüber anderen Geweben, die sich leicht in der erforderlichen Dicke von $0,1-0,3\ \mu$ schneiden lassen, beim Knorpel in der größeren Härte und Sprödigkeit.

Knorpelstücke von höchstens $10\ \text{mm}^3$ wurden in 10% Formalin oder in 2% OsO_4 1—2 Tage lang fixiert, hierauf nach der BRETSCHNEIDERSchen Methode in Wachs-Paraffin eingebettet (11). Geschnitten wurde das Material mit dem von

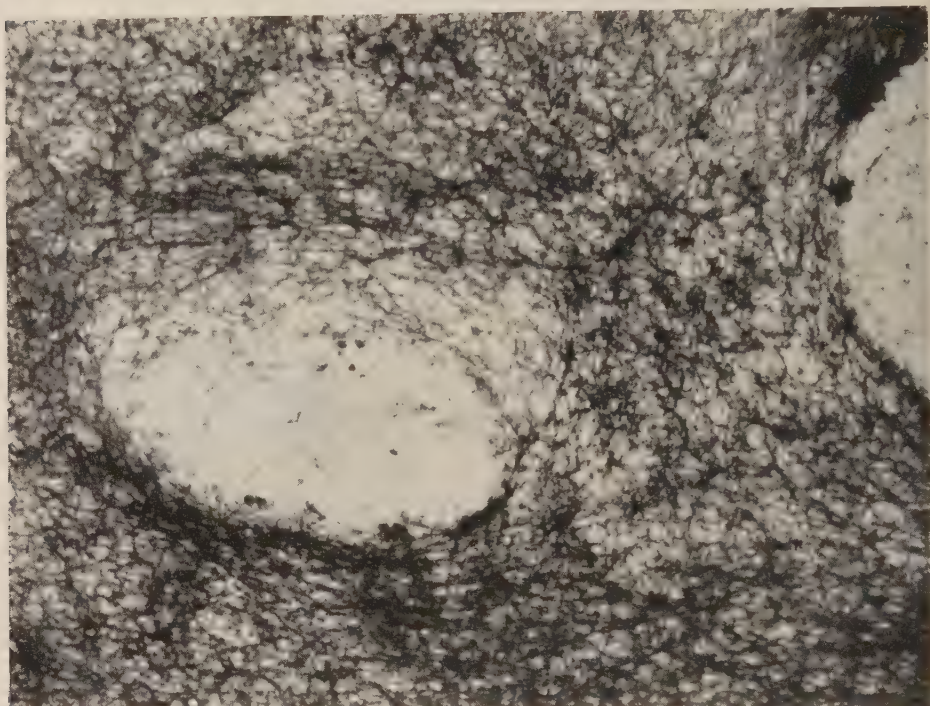


Abb. 1. Rippenknorpel eines neugeborenen Menschen. Fixation OsO_4 2%, 24 h Paraffin-Wachseinbettung. Vergrößerung total 6400mal. Schnittdicke $0,1\ \mu$. Kollagene Fasern bilden ein äußerst feines, engmaschiges Netz, das die Zellen umhüllt.

DANON und Kellenberger (12) beschrieben ein Mikrotom (hergestellt von der Firma Trüb-Täuber, Zürich), welches auch von sehr harten, gealterten Knorpeln nach Entkalkung Schnitte von $0,1-0,2\ \mu$ ermöglichte. Die Schnitte wurden auf $50-60^\circ\text{C}$ warmem Wasser, dem als Benetzungsmittel einige Tropfen Kodak-Photo-flo beigegeben wurden, ausgebreitet, auf die übliche Folie aufgezogen, im Wärmeschrank angetrocknet und mit Toluol entparaffiniert. Die Aufnahmen wurden mit dem Trüb-Täuber-Elektronenmikroskop (Strahlspannung 50 kV) des anorganisch-chemischen Instituts der Universität Bern gemacht¹⁾.

¹⁾ Das Elektronenmikroskop stand uns dank den Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes zur Verfügung. Herrn Dr. STUDER danken wir für seine Mithilfe bei den Aufnahmen, Frl. N. PFENNINGER für die Mithilfe bei der Anfertigung der Schnitte.

Ergebnis: Abb. 1 zeigt einen $0,1 - 0,15 \mu$ dicken Schnitt durch Rippenknorpel eines menschlichen Neugeborenen in 6400facher Vergrößerung, Abb. 2 einen gleichartigen Schnitt durch den Schildknorpel einer Frühgeburt im 7. Monat (Vergr. 4900mal). Was zuerst auffällt, ist die überraschend große Zahl von Fasern, die, sich nach allen Richtungen durchflechtend, ein engmaschiges Netzwerk darstellen. Bei starker Vergrößerung (Abb. 3, 17500mal) lassen sich die einzelnen

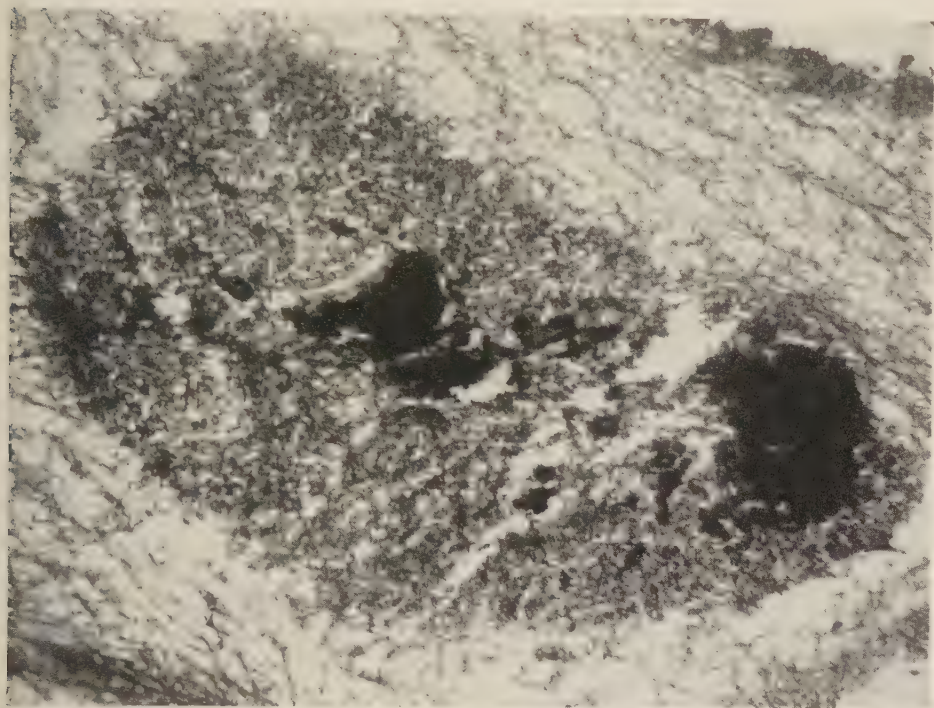


Abb. 2. Trachealknorpel einer menschlichen Frühgeburt im 7. Monat. Fixation OsO₄ 2%, 2 h. Paraffin-Wachseinbettung. Totalvergrößerung 4900mal. Schnittdicke $0,1 \mu$. Das Protoplasma der Knorpelzelle stellt sich als feinkörnige, dichte Masse dar, in die Kernsubstanzen? und Mitochondrien? eingelagert erscheinen.

Fasern deutlich erkennen. Ihre Breite ist, wie bei den von WOLPERS (10) aus Knorpeln isolierten Fasern, wechselnd. Sie schwankt in unseren Bildern Osfixierter Schnittpräparate bei menschlichen Neugeborenen zwischen 180 und 1100 Å. Die für Kollagen typische Querstreifung ist oft recht deutlich sichtbar. Die Fasern verlaufen in der Hauptsache gradlinig, seltener leicht gebogen. Sie umspinnen die Zellen in etwas einheitlicher gerichteten, immer noch stark verflochtenen, breiten Zügen. Zwischen den Fasern stellt sich die Chondromucoidsubstanz in Form feinsten, oft unscharf begrenzter, bis 100 Å großer Körnchen und „Wolken“ dar. Diese erinnern an die von BRETSCHNEIDER (11) beschriebenen Gebilde zwischen den kollagenen Fasern des Knochens von *Balaenoptera musculus*.

Es läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, bis wie weit diese Strukturen der wirklich vorhandenen Substanz entsprechen und ob sie nicht z. T. bei der Präparation als Kunstprodukt entstehen. Eines ist jedenfalls sicher und verdient in diesem Zusammenhang erwähnt zu werden, daß wir diese, der Interfibrillarsubstanz entsprechenden Körnchen bei Formalin-fixierten Knorpeln nie feststellten. Wie Abb. 4, Schnitt durch Formalin-fixierten Rippenknorpel eines 72jährigen Mannes, zeigt, sind die Räume zwischen den Fasern leer (vgl. auch Abb. 6). (Bemerkenswert

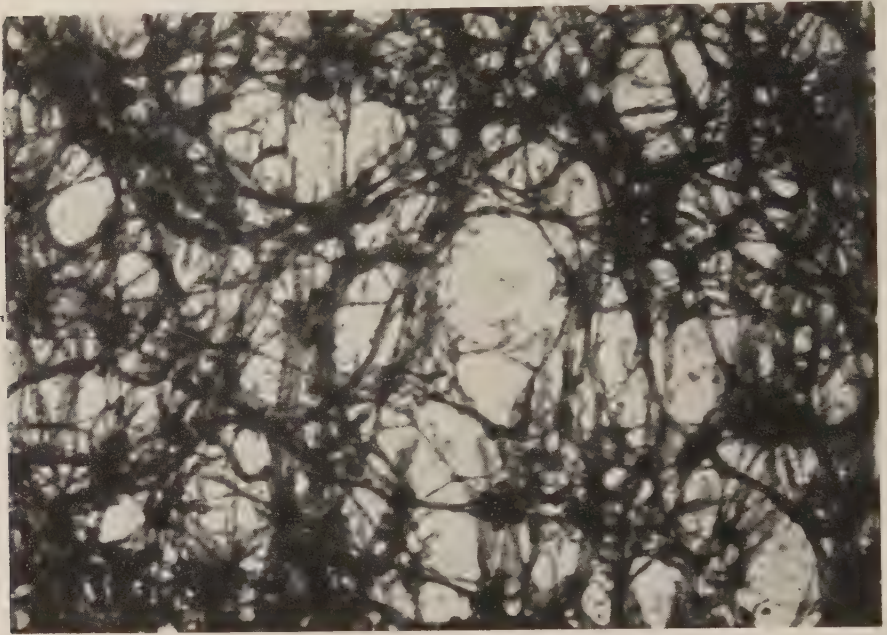


Abb. 3. Rippenknorpel eines neugeborenen Menschen. Fixation OsO_4 2%, 24 h. Paraffin-Wachseinbettung, Totalvergrößerung 17500 mal. Schnittdicke $0,1 \mu$.

Das Fasernetz des hyalinen Knorpels zeigt verschieden dicke Elemente, die oft Querstreifung erkennen lassen. Zwischen den Fasern stellt sich die Chondromucoidsubstanz als feine Körnchen und Wolken dar.

ist hier auch die altersbedingte Verdickung und der Fasern Vergrößerung der Struktur.) Daß sich beim Formalin-fixierten Knorpel kaum je Querstreifen der Fasern nachweisen läßt, könnte dahin ausgelegt werden, daß unter dem Einfluß des Fixationsmittels die Chondromucoidsubstanz schrumpft und sich dabei mantelartig um die Faser legt. So würden die, wenigstens z. T. durch eine rhythmische Dickenzunahme bedingten Querstreifungsfiguren verhüllt und maskiert. Selbstverständlich können auch Einflüsse der Präparation mit Längsverschiebung der Moleküle innerhalb der Fasern (SCHMITT und GROSS) (5) oder direkte Schä-

digung durch die Elektronenstrahlen (PERRON und WRIGHT) (13) die Feinstruktur verwischen²⁾.

Alterung und Nekrose des Knorpels äußern sich zuerst immer an der interfibrillären Substanz, während die kollagenen Fasern sich als sehr widerstandsfähig erweisen. Die im Lichtmikroskop zu beobachtende Demaskierung der Fasern (asbestartige Degeneration) ist bedingt durch eine Verflüssigung der Chondromucoids substanz. Abb. 5 zeigt einen Schnitt durch partiell nekrotischen Knorpel

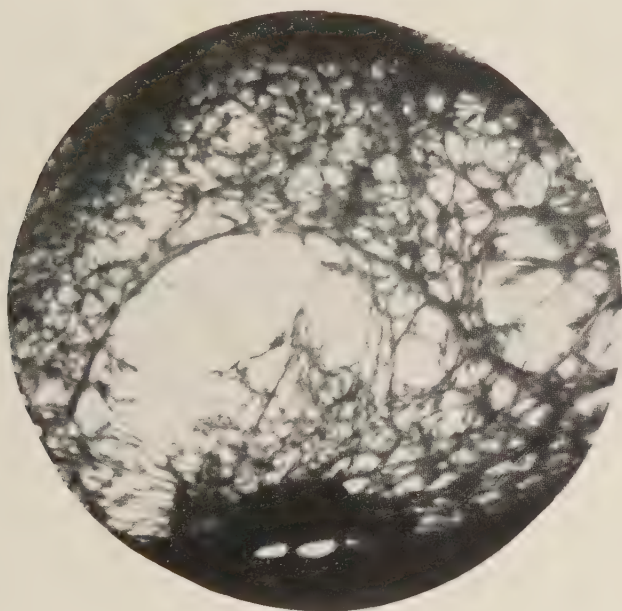


Abb. 4. Rippenknorpel eines 72jährigen Mannes. Fixation 10% Formalin mehrere Tage, Entkalkung in 5% HNO_3 . Paraffin-Wachseinbettung. Totalvergrößerung 3000mal. Schnittdicke etwa $0,1 \mu$.

Die Fasern sind verdickt, die Struktur vergrößert. Interfibrillarräume sind leer (Schrumpfung der Chondromucoids substanz). Zellprotoplasma geschrumpft.

einer Discushernie bei einem 62jährigen Individuum. Es zeigt sich ein für ein Schnittpräparat besonders deutliches Hervortreten der Fasern mit scharfer Darstellung der Querstreifung. Die Chondromucoids substanz wurde bei der Verflüssigung offenbar in ihrem molekularen Aufbau derart vereinfacht, daß sie im elektronenmikroskopischen Bild nicht mehr oder viel weniger stark dargestellt wird und des-

²⁾ Nach den Untersuchungen von NUTTING und BORASKY (6) an Einzelfasern hat die Formalin-Fixation keinen wesentlichen Einfluß auf die Feinstruktur, abgesehen von einer gewissen Schrumpfung, so daß das Fehlen der Querstreifung in unseren Bildern durchaus im beschriebenen Sinne erklärbar ist. Um so mehr noch deshalb, als WOLPERS (3) bereits in seiner ersten Arbeit über das Kollagen eine fleckige oder granulierte, die Fasern umhüllende und feine Strukturen verdeckende Grundsubstanz aus ungeformten Eiweißen nachwies.

halb die Fasern besser hervortreten läßt. Auf diese Verhältnisse soll in einer späteren Arbeit näher eingegangen werden.

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen der Fixation durch Formalin und Osmium ergibt sich bei der Betrachtung des Protoplasmas der Knorpelzelle. Bereits bei Beobachtung im Lichtmikroskop ist die Labilität und die Schrumpfungstendenz für das Protoplasma des hyalinen Knorpels kennzeichnend (SCHAF-

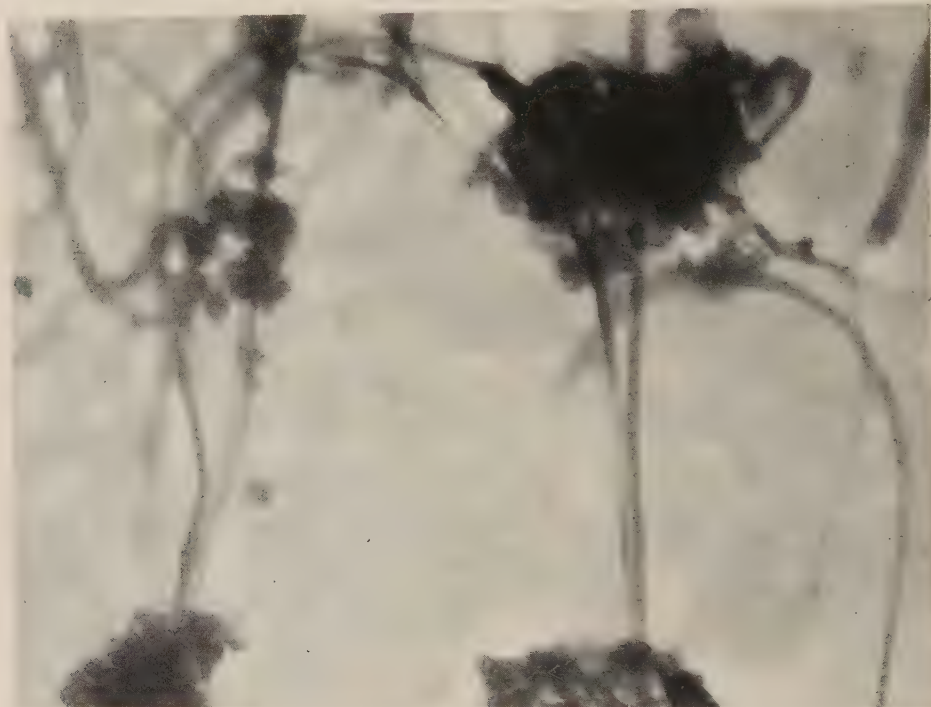


Abb. 5. Discushernie bei 62jährigem Mann, weitgehende Nekrose des Knorpels (Schnittpräparat). Fixation OsO_4 2%, 24 h, Paraffin-Wachseinbettung. Totalvergrößerung 30000 mal. Schnittdicke $0,1 \mu$.

Deutliche Darstellung der Fasern infolge partieller Verflüssigung der Interfibrillarsubstanz.

FER) (14). Bei Fixation mit Formalin schrumpft das Protoplasma außerordentlich stark und stellt sich im elektronenmikroskopischen Bild als sehr dichter, unstrukturierter oder hier und da grobfaseriger, scharfbegrenzter Klumpen in der Zellmitte dar. (Abb. 4 links im Bild, Abb. 6.) Regelmäßig werden bei diesem Schrumpfungsprozeß die innersten, der die Zelle umspinnenden Fasern der Zwischensubstanz mitgerissen. Das mag ein Hinweis sein auf die besonders enge Verbindung des Fasergerüsts mit den Zelleiweißen im Bereiche der „semipermeablen Membran“. Beim Osmium-fixierten Knorpel schrumpft das Protoplasma sehr oft auch, reißt aber immer innerhalb der Zellgrenze, so daß ein Teil am Zellrand zurückbleibt (Abb. 1, halbgetroffene Zelle). Das intakte Zellprotoplasma stellt sich

Osmium-fixiert als ziemlich dichte, feinkörnige Substanz dar, in der oft um $0,6\ \mu$ große, scharf begrenzte, rundliche oder längliche, dichte Körperchen feststellbar sind. Diese entsprechen vielleicht den Mitochondrien (GESSLER und Mitarb., CLAUDE) und Mitarb. (15, 16). Besonders in Meerschweinchenknorpel fanden wir oft reichliche kleine oder bis $5\ \mu$ große, mit Osmium tiefschwarz gefärbte, runde Fetttropfen.

Am schlechtesten sind in unseren Schnitten die Zellkerne dargestellt. Regelmäßige Kernmembran und -struktur, wie wir sie in Schnitten parenchymatöser

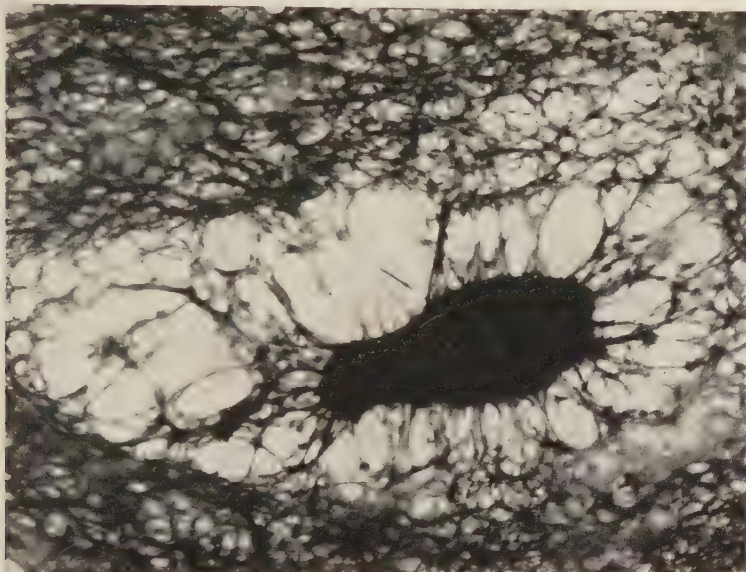


Abb. 6. Rippenknorpel, Mensch, 1 Monat alt. Fixation Formalin 10% mehrere Tage. Paraffin-Wachseinbettung. Totalvergrößerung 7500mal. Schnittdicke $0,15\ \mu$. Das schrumpfende Zellprotoplasma hat die Innersten Fasern der Zwischensubstanz mit sich gerissen.

Organe immer finden, ließen sich bis jetzt nicht darstellen. Sehr oft findet man in der Zellmitte eine Anhäufung grober, dichter, verkrümmter Stäbchen von $1-2\ \mu$ Länge, bei welchen es sich wohl um Bestandteile des sehr empfindlichen, durch Präparation und Schnitt geschädigten Zellkerns handelt.

Zusammenfassung

An Hand elektronenmikroskopischer Bilder von Schnitten durch menschlichen hyalinen Knorpel wird der Aufbau von Knorpelzelle und Zwischensubstanz erläutert. In der Zwischensubstanz erscheint ein äußerst feines und dichtes Netz verschieden breiter, kollagener Fasern, zwischen die die Chondromucoidsubstanz als feine körnige oder wolkige Masse eingelagert erscheint. Im gealterten Knorpel ist die Struktur vergrößert und die Fasern sind verdickt. Der Einfluß von Formalin

und Osmium auf Zwischensubstanz und Zelle wird diskutiert. Die Knorpelzellen enthalten das sehr leicht schrumpfende Protoplasma, das sich bei geeigneter Fixation als feinkörnige, ziemlich dichte Masse abbildet. Im Protoplasma finden sich etwas größere Körnchen (Mitochondrien?) und nicht selten Fetttropfen.

Schrifttum

- 1) BEAR, R. S.: J. Am. Chem. Soc. 64, 727 (1942).
- 2) HALL, C. E., M. A. JAKUS, and F. O. SCHMITT: J. Am. Chem. Soc. 64, 1234 (1942).
- 3) WOLPERS, C.: Klin. Wschr. 22, 624 (1943).
- 4) GROSS, J., and F. O. SCHMITT: J. exper. Med. 88, 555—568 (1948).
- 5) SCHMITT, F. O., and J. GROSS: J. Amer. Leather chem. Assoc. 43, 658—675 (1948).
- 6) NUTTING, G. C. and R. BORASKY: J. Amer. Leather chem. Assoc. 43, 96—110 (1948).
- 7) PORTER, K., and P. VANAMEE: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 513—516 (1949).
- 8) PRATT, W. W., and R. W. G. WYCKOFF: Biochim. Biophys. Acta 5, 166—174 (1950).
- 9) VANAMEE, P., and K. R. PORTER: J. exper. Med. 94, 255—268 (1951).
- 10) WOLPERS, C.: Virchows Archiv 312, 292—302 (1944).
- 11) BRETSCHNEIDER, L. H.: Proceedings Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen, 52, 654—665 (1949).
- 12) DANON, D., et E. KELLENBERGER: Archives des sciences 3, 169—174 (1950).
- 13) PERRON, R. R., and B. A. WRIGHT: Nature 166, 863—864 (1950).
- 14) SCHAFFER, J., zit. nach PETERSEN, H.: „Histologie und mikroskopische Anatomie“ München 1924.
- 15) GESSLER, A. E., C. E. GREY, M. C. SCHUSTER, J. J. KELSCH, and M. N. RICHTER: Cancer Research 8, 534—548 (1948).
- 16) CLAUDE, A., and E. F. FULLAM: J. exper. Med. 83, 499 (1946).
- 17) NECKEL, I.: Z. wiss. Mikrosk. 60, 298—307 (1951).

[Eingegangen am 3. Januar 1952]

Protistenstudien I.

Pro- und Nesselkapseltrichocysten der Ciliaten-Gattung PRORODON

Von **K. E. Wohlfarth-Bottermann** und **G. Pfefferkorn**

Mit 13 Abbildungen

Die Trichocysten der Ciliaten sind Zellorganelle mit sehr unterschiedlicher Gestalt und Funktion. Die grundlegende vergleichende morphologische Untersuchung und Klassifizierung verdanken wir KRÜGER (1, 2), der auf Grund von Dunkelfelduntersuchungen zwischen Protrichocysten, Spindeltrichocysten und Nesselkapseltrichocysten unterschied.

Während einige Spindeltrichocysten bereits Gegenstand elektronenoptischer Arbeiten gewesen sind (JAKUS [3], JAKUS and HALL [4], PEASE [5], WOHLFARTH-BOTTERMANN [6, 7], LEHMENSICK [8], BEYERSDORFER [9], KNOCH und KÖNIG [10], KRÜGER und WOHLFARTH-BOTTERMANN [11], WOHLFARTH-BOTTERMANN und PFEFFERKORN [12]), KRÜGER, WOHLFARTH-BOTTERMANN und PFEFFERKORN [13]), fehlen bislang gleiche Untersuchungen in den Pro- und Nesselkapseltrichocysten. — Die Gattung *Prorodon* erschien uns, sowohl wegen der zum Teil beträchtlichen Größe der Tiere als auch wegen des gleichzeitigen Besitzes beider Trichocystentypen, für eine erste Untersuchung besonders geeignet, zumal KRÜGER (1) bereits 1934 diese Gattung einer eingehenden ultramikroskopischen Analyse unterzogen hatte.

Material und Technik

Aus einem Axolotl-Aquarium des Zoologischen Instituts stand uns eine *Prorodon*-Population in ausreichender Menge zur Verfügung. Eine sichere Artbestimmung (KAHL [14, 15]) ist bei den verschiedenen *Prorodon*-Arten noch nicht ganz möglich, wäre jedoch in diesem Falle auch zwecklos gewesen, da eine systematische Untersuchung jedes einzelnen Tieres aus dem uns zur Verfügung stehenden Artengemisch vor Aufbringen auf den Kollodiumfilm aus folgendem Grunde nicht ratsam war: Bei lichtmikroskopischer Beobachtung, auf die bei einer genauen Bestimmung nicht verzichtet werden kann, würde schon durch den Druck des Deckglases eine Ausscheidung von Trichocysten hervorgerufen, die dann kaum mit Sicherheit auf den Kollodiumfilm übertragen werden könnten. Auf Grund der ultramikroskopisch gewonnenen Angaben von KRÜGER (1, 2) konnten wir aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen feststellen, welche Trichocysten zum Typ „margaritifer-edentatus“ bzw. zum Typ „teres“ gehörten.

Für die Protrichocysten spielt diese Frage nur eine untergeordnete Rolle, da sich diese Trichocysten innerhalb der Gattung *Prorodon* nicht in wesentlichen Merkmalen voneinander unterscheiden.

Die Tiere wurden nach Entnahme aus dem Aquarium gründlich durch Umsetzen mit Mikropipetten in destilliertem Wasser gewaschen und einzeln in einem kleinen Tropfen auf die Kollodiumfolie gebracht, die auf einem Kupferdrahtnetz ruhte. Nach Eintrocknung des Tropfens bei Zimmertemperatur gelangten die Präparate ohne weitere Vorbehandlung zur Untersuchung. Zur Ergänzung dieser Technik wurden Oberflächenabzüge hergestellt sowie Originalpräparate mit Silber oder Platin-Rhodium schräg bedampft. Aus 250 durchgemusterten Objektträgern gewannen wir 200 Aufnahmen.

A. Protrichocysten

BRESSLAU (16), SCHNEIDER (17) und KRÜGER (1, 2) haben der Gestalt und der Funktion der Protrichocysten (= Tektinstäbchen) lichtmikroskopische Untersuchungen gewidmet. Hiernach stellen diese Organelle das Material, womit sich die Infusorien unter ungünstigen Lebensbedingungen encystieren. Daher konnte eine fast allgemeine Verbreitung unter den Ciliaten (mit Ausnahme der Hymenostomata), wie sie SCHNEIDER (17) beschrieben hat, nicht verwundern. Die Protrichocysten sind lichtmikroskopisch auf Grund ihrer Größe sowohl im Hellfeldmikroskop mit Hilfe der BRESSLAUSchen Tusche-Methode als auch im Ultramikroskop durch Anlagerung von Mikronen sichtbar zu machen, jedoch erkennt man so nur ihre Umrisse.

Im Elektronenmikroskop zeigen sich die ausgeschiedenen Protrichocysten als mehr oder weniger dunkle Schatten. Ihre Trockenmasse streut die Elektronen so wenig, daß selbst 25-kV-Elektronen nur einen geringen Kontrast ergeben. Bei Emissionsspannungen von 50 kV sind stark gequollene Stadien ohne Elektronenkontrastfärbung oder Anlagerung von stärker streuenden Fremdstoffen kaum noch zu erkennen.

Wir fanden Protrichocysten verschiedener Dichte und Ausdehnung von 5–35 μ Länge und 1–6 μ Breite, die in Abb. 1–3 dargestellt sind. Sie zeigen immer eine längliche Form; teilweise sind sie an einem Ende mit einer leichten Einschnürung versehen, so daß man von einem „Köpfchen“ sprechen könnte (Abb. 1 d, 2 a, 3 a). Bei reinen Durchstrahlungspräparaten scheint eine einheitliche Substanz ohne Innenstruktur vorzuliegen. Metallbedampfte Objekte lassen ebenfalls keine ausgeprägten Strukturen erkennen. Die Objekte sind so flach aufgetrocknet, daß selbst an den Rändern keine Bedampfungsschatten auftreten.

Gelegentlich fand sich in den Protrichocysten eine Ausscheidung von Kristallnadeln (Abb. 2 b), die in dieser Form in den Nesselkapseltrichocysten der gleichen Präparate nicht beobachtet wurde. Da elektronenmikroskopisch nachweisbare Salzkristalle an den Paramecium-Trichocysten von funktioneller Bedeutung sind (WOHLFARTH-BOTTERMANN [6, 7]), wäre in weiteren Untersuchungen darauf zu achten, ob sich die hier beschriebene Erscheinung wiederholt.

Tafel 1.

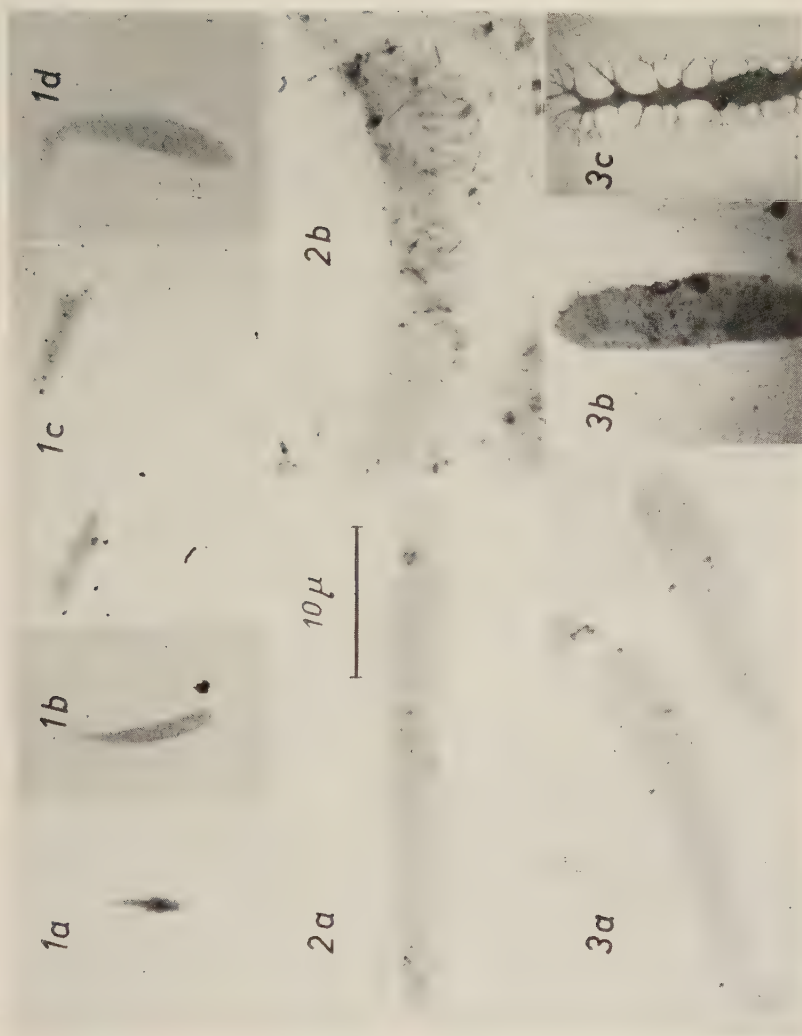


Abb. 1a—d. Stadien zunehmender Quellung von Protrichocysten
Elektronenoptisch 1000 \times — Endvergrößerung 2000 \times , 40 kV.

Abb. 2. a vollständig gequollene Protrichocyste, b Protrichocyste mit Kristallnadeln
Elektronenoptisch 1000 \times — Endvergrößerung 2000 \times , 25 kV.

Abb. 3. a—c Stadien zunehmender Entquellung von Protrichocysten
Elektronenoptisch 1000 \times — Endvergrößerung 2000 \times , 25 kV.

Ein „Trichocystenkorn“, das KLEIN (18) lichtmikroskopisch nachweisen zu können glaubte, konnte in unseren Präparaten nie beobachtet werden. Auch eine von SCHNEIDER (17) vermutete „Zwischensubstanz“, die für die Verklebung der Protrichocysten zu einer Cyste verantwortlich sein soll, ist nicht vorhanden. Eine solche Substanz ist für die Verklebung auch gar nicht erforderlich, da durch das Fehlen einer Trichocystenhülle die gelartigen Körper ohne weiteres miteinander verkleben können.

Der schwache Elektronenkontrast spricht für Gebilde mit sehr geringer Trockenmasse, die nach der Ausscheidung durch starke Wasseraufnahme zu relativ bedeutender Größe anschwellen. Es scheint eine annähernd isotrope Quellung vorzuliegen, wobei nicht vollkommen gequollene Trichocysten sich von vollständig gequollenen lediglich durch geringere Größe und erhöhte Massendichte unterscheiden. Aber selbst die frühesten und kompaktesten Stadien (Abb. 1a u. 1b) sind mit 40-kV-Elektronen noch durchstrahlbar.

In einigen Präparaten (Abb. 3b u. 3c) zeigte sich ein interessanter Entquellungseffekt; die gequollenen Protrichocysten blieben nur an einigen Stellen ihres Umfangs an der Objektträgerfolie haften, so daß die abgebildeten Strukturen zustande kamen. Daß die meisten Trichocysten in ihrer einmal erreichten Ausdehnung flächig eintrocknen, spricht auch für ihre hohe Klebkraft, die gegenüber Protrichocysten selbst noch wesentlich höher sein dürfte. — Das Erhärten der Zystenwandung während der Encystierung beruht wahrscheinlich auf Entquellung.

Die Größen der Protrichocysten, die wir in unseren Präparaten fanden, sind meist kleiner, als sie KRÜGER (1, 2) ultramikroskopisch (32μ lang, 6μ breit) bestimmte. Dies dürfte auf den Trocknungsvorgang in unserer Präparation zurückzuführen sein, wobei meistens nicht entschieden werden konnte, ob der maximale Quellungsgrad infolge schneller Eintrocknung nicht erreicht oder ob bereits eine Entquellung eingetreten war.

B. Nesselkapseltrichocysten

Über die ultramikroskopische Struktur dieser Organelle, die man für Angriffs- oder Abwehrwaffen hält, sind wir durch die eingehenden Arbeiten von KRÜGER (1, 2) unterrichtet. Wir möchten hier auf die ausführliche Wiedergabe seiner Befunde verzichten und auf die Originalarbeiten verweisen. Hiernach kann man bei Prorodon zwischen einem edentatus-margaritifer-Typ und einem teres-Typ unterscheiden. Das Elektronenmikroskop bot die Möglichkeit, durch eine sublicht-

Abb. 4. Ruhende, nicht ausgeschleuderte Nesselkapseltrichocyste
Elektronenoptisch $10150\times$ — Endvergrößerung $13000\times$, 40 kV

Abb. 5. Leere Kapsel und Teil des Fadens einer ausgeschleuderten Nesselkapseltrichocyste,
mit Silber schräg bedampft
Elektronenoptisch $10150\times$ — Endvergrößerung $13000\times$, 40 kV

Abb. 6 wie Abb. 5, ohne Schrägbedampfung
Elektronenoptisch $10150\times$ — Endvergrößerung $13000\times$, 40 kV

Abb. 7. Teil des Fadens der in Abb. 6 dargestellten ausgeschleuderten Nesselkapseltrichocyste
Elektronenoptisch $10150\times$ — Endvergrößerung $13000\times$, 40 kV

Tafel 2.



mikroskopische Untersuchung der Morphologie der Grundsubstanz die Frage zu entscheiden, inwieweit die von BRESSLAU und SCHNEIDER (17) geäußerte Ansicht zu Recht besteht, wonach man alle Trichocystenformen zusammenfassend als „Tektinausscheidungen“ bezeichnen darf. Auch waren wir bestrebt, weitere Einzelheiten über die Struktur und den Ausschleuderungsprozeß zu erfahren. — In unseren Präparaten fanden sich sowohl ruhende Stadien, wie sie innerhalb der Zelle vorkommen, als auch vollkommen ausgeschleuderte Trichocysten sowie Zwischenstadien.

Die auch schon lichtmikroskopisch erkennbaren 9–17 μ langen und 0,3–0,6 μ breiten ruhenden Trichocysten sind stäbchenförmige, geschlossene Kapseln, die einen meist geraden „Innenstab“ erkennen lassen (Abb. 4 u. 13). Dieser ist so kompakt, daß er mit Elektronen von 40 kV Emissionsspannung kaum durchstrahlt werden konnte. Besonders nach Schrägbedampfung zeigte sich, daß die Kapsel nur eine relativ dünne Wand besitzt, während der Innenstab, der vermutlich ebenfalls ein Rohr ist, einen stärkeren Schatten wirft und sich so als reell vorhandene Massenstruktur ausweist (Abb. 9 u. 13). Am Innenstab waren weitere Einzelheiten nicht zu erkennen. Gelegentlich zeigte sich der Innenstab etwas gewellt (Abb. 13).

Bei vollständig ausgeschleuderten Trichocysten ist zwischen der nun leeren Kapsel (Abb. 5 u. 6) sowie dem Trichocystenfaden (Abb. 7) zu unterscheiden (margaritifer-edentatus-Typ). Beim teres-Typ schließt sich an den Trichocystenfaden noch ein Fadenendstück an (Abb. 12). Die leeren Kapseln wiesen an beiden Enden Strukturen auf, die an Oberflächenabzügen und Bedampfungspräparaten besonders hervortraten. Sie zeigten gegenüber dem restlichen Teil der Kapsel deutliche Schatteneffekte. An der dem Trichocystenfaden abgewandten Seite handelt es sich wahrscheinlich um eine Verstärkungsstruktur, an der dem Faden zugewandten Seite offenbar um eine Verschlusvorrichtung der Kapsel (Abb. 5 u. 6). Letztere besteht aus zwei besonders kompakten Querstrukturen, einer manschettenförmigen Hülse sowie einem in Abb. 5 u. 6 deutlich erkennbaren nach

Abb. 8. Nesselkapseltrichocyste kurz nach Beginn des Ausschleuderungsprozesses
Elektronenoptisch 10150 \times — Endvergrößerung 13000 \times , 40 kV

Abb. 9. Ausschnitt aus Abb. 8 nach Bedampfung des Präparates mit Platin-Rhodium
Elektronenoptisch 10150 \times — Endvergrößerung 18000 \times , 40 kV

Abb. 10. Spitze des Trichocystenfadens einer Nesselkapseltrichocyste, deren Ausschleuderungsprozeß fast vollendet ist
Elektronenoptisch 10150 \times , — Endvergrößerung 14500 \times , 45 kV

Abb. 11. Beginnender, aber pathologisch verlaufener oder gestörter Ausschleuderungsprozeß.
Rechts Kapsel, links bereits hervorgeschobener Teil des Innenstabes, mit Platin-Rhodium
schräg bedampft

Elektronenoptisch 10150 \times — Endvergrößerung 14500 \times , 40 kV

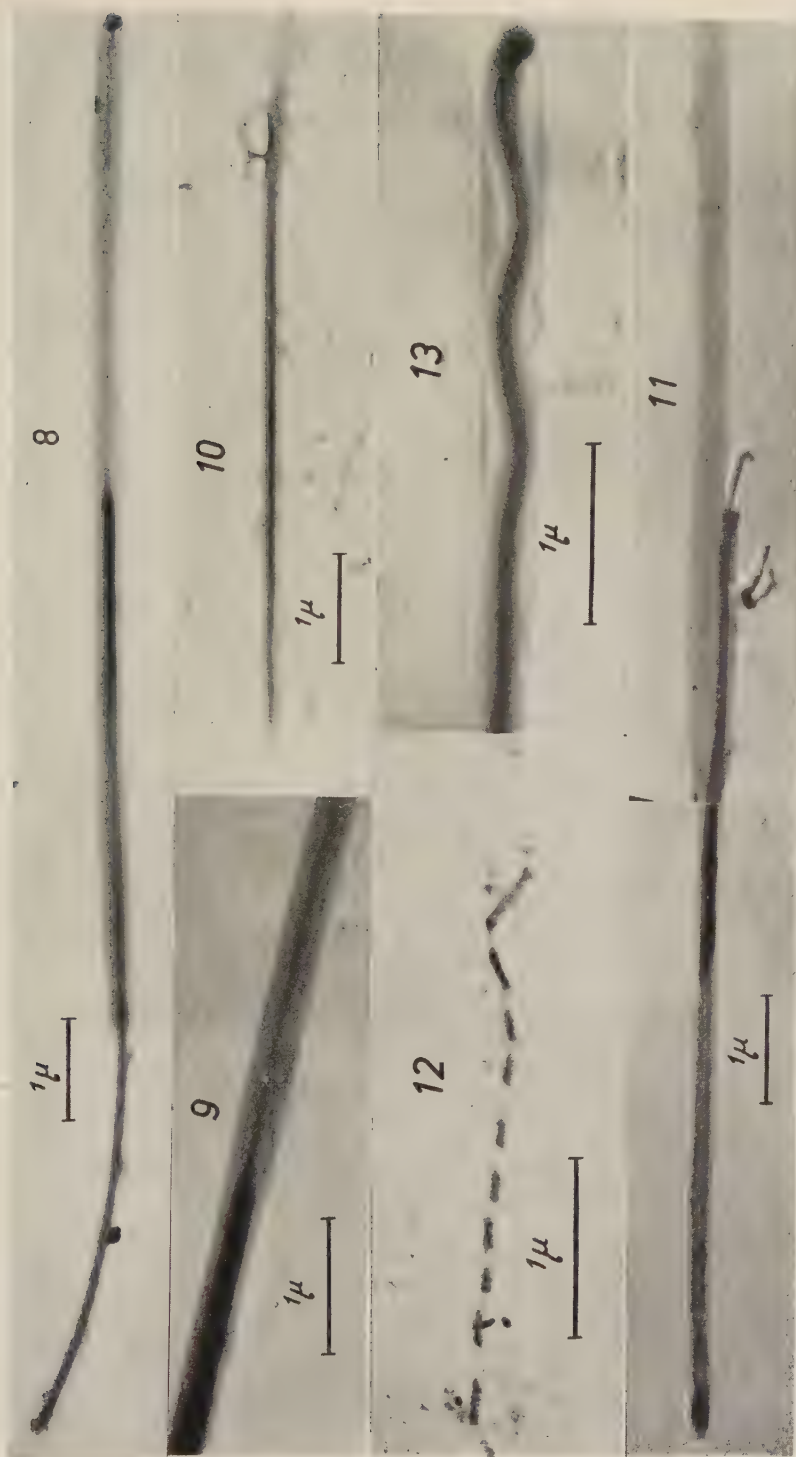
Abb. 12. Trichocystenfaden mit darüberliegendem in Einzelstücke zerbrochenen Endfaden,
mit Platin-Rhodium schräg bedampft

Elektronenoptisch 10150 \times — Endvergrößerung 24000 \times , 40 kV

Abb. 13. Teil einer ruhenden Nesselkapseltrichocyste mit Schlingelung des Innenstabes an
einem Ende, mit Platin-Rhodium schräg bedampft

Elektronenoptisch 10150 \times — Endvergrößerung 24000 \times , 40 kV

Tafel 3.



oben geklappten Deckelchen. — Der schlauchförmige Trichocystenfaden besitzt eine Länge von $18-32\mu$ und eine Breite von $0,2-0,3\mu$ und ist ebenso wie die leere Kapsel mit 40-kV-Elektronen gut durchstrahlbar (Abb. 7). Nicht durchstrahlbar dagegen ist bei einer solchen Emissionsspannung das Fadenendstück, das nur eine Breite von $0,05\mu$ besitzt, dafür aber gegenüber dem Trichocystenfaden äußerst kompakt ist und in den meisten Fällen zerbrochen vorgefunden wurde (Abb. 12). In allen Teilen der Nesselkapseltrichocysten konnten wir keine Anzeichen der für alle bisher untersuchten Spindeltrichocysten typischen Querstreifung finden.

Für die Frage, in welcher Weise Trichocystenfaden und Fadenendstück in der ruhenden Kapsel präformiert sind, sowie für die Analyse des Ausschleuderungsprozesses, sind zunächst die Längenverhältnisse der Kapsel, des Trichocystenfadens und des Endfadens zueinander von Bedeutung. Wir konnten die Ergebnisse von KRÜGER (1, 2) bestätigen, wonach Kapsel und Trichocystenfaden im Verhältnis 1 : 2 und Kapsel und Endfaden im Verhältnis 1 : 1 stehen.

Zwischenstadien des Ausschleuderungsprozesses, bei denen der Vorgang der Umwandlung der ruhenden Trichocyste in die ausgeschleuderte Trichocyste zwar begonnen aber nicht vollendet war, fanden wir häufig. In Abb. 8 ist eine solche Trichocyste dargestellt, deren Ausschleuderung soeben begonnen hat. Wie deutlich zu erkennen ist, schiebt sich der Innenstab durch die jetzt allerdings noch nicht sichtbare Verschlussvorrichtung nach außen und wird an seinem bereits außerhalb der Kapsel befindlichen Teil von einem leichter durchstrahlbaren Saum umgeben, der wohl ein bereits ausgebildetes Stück Trichocystenfaden darstellen dürfte. Es läßt sich dann verfolgen, wie der Innenstab immer weiter in dem bereits ausgebildeten Teil des Fadens nach vorne vorrückt, um sich in den Trichocystenfaden zu verwandeln und an der Spitze des immer länger werdenden Fadens langsam zu verbrauchen. Abb. 10 zeigt diesen Prozeß kurz vor seinem Abschluß, rechts ein Teil des fertigen und durchstrahlbaren Fadens, links das noch in Umwandlung befindliche Fadenstück. — Abb. 11 ist aus einem mit Platin-Rhodium bedampften Präparat gewonnen; dieses Zwischenstadium entspricht in seiner Entwicklungsstufe ungefähr dem aus Abb. 8, muß jedoch als pathologisch gewertet werden, da der Innenstab sich offenbar von der Kapsel gelöst hat. Besonders im Gebiet der Kapsel zeigen sich interessante Struktureinzelheiten.

Der Ausschleuderungsprozeß ist von KRÜGER (1, 2) auf Grund von ultramikroskopisch beobachteten Zwischenstadien als handschuhfingerförmige Ausstülpung eines in ganzer Länge in der ruhenden Kapsel präformierten Fadens gedeutet worden; daraus ergab sich für KRÜGER die Notwendigkeit, bei einem Längenverhältnis des Fadens zur Kapsel von 2 : 1 eine einmalige Faltung des Fadens in der Kapsel anzunehmen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der ruhenden Stadien zeigten jedoch, daß der zukünftige Trichocystenfaden sowie insbesondere der Endfaden nicht in der von KRÜGER vermuteten Weise in den Ruhestadien angeordnet ist. Dies ist für die Beurteilung der Mechanik des Ausschleuderungsprozesses sehr wichtig. Soweit wir bisher erkennen können, besitzen die ruhenden Nesselkapseln den oben beschriebenen unerwartet einfachen Aufbau.

Bei der Diskussion über den Verlauf des Ausschleuderungsprozesses wollen wir uns auf die Deutung der von uns erhaltenen elektronenmikroskopischen Bilder beschränken. — Verschiedene unserer nicht veröffentlichten Bilder sprechen für die Theorie von KIECKHEF, daß ein Umstülpungsprozeß stattfindet. Die Umwandlung unseres Innenstabes in den Trichocystenfaden kann jedoch vorerst allein durch eine Umstülpung nicht erklärt werden, da der Innenstab nur einfache und nicht doppelte Kapsellänge besitzt. Allerdings muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der Innenstab ein Doppelrohr darstellt: Abb. 11 deutet darauf hin, daß Trichocystenfaden und Endfaden in voller Länge in der ruhenden Kapsel präformiert sind, und zwar der Trichocystenfaden als zwei ineinander geschobene Röhre, wovon das innere Rohr noch den kompakten Endfaden enthält. Der Ausschleuderungsprozeß würde hiernach in einer einfachen Ausschachtelung evtl. unter Beteiligung einer Umstülpung bestehen. Für den Endfaden steht eine solche Annahme im Einklang mit den ultramikroskopischen Befunden von KIECKHEF. Da jedoch ein so stark pathologisches Stadium, wie es in Abb. 11 dargestellt wurde, mit Vorbehalten ausgewertet werden muß, weil man nicht weiß, wie weit die hier sichtbar werdenden Strukturen als normal anzusprechen sind, so bliebe noch eine andere Erklärungsmöglichkeit: Sollte der „Innenstab“ nur ein einfaches Rohr darstellen, das kein weiteres Rohr, sondern nur den Endfaden im Innern besitzt, so würde eine geordnete Streckung dieses Rohres auf seine doppelte Länge die Umwandlung des Innenstabes in den Trichocystenfaden erklären. Eine Schlängelung des Innenstabes (Abb. 12) könnte als beginnende Streckung gedeutet werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Nesselkapseltrichocysten werden voraussichtlich weitere Hinweise zur Lösung dieses Problems bringen. Eine polarisationsoptische Untersuchung der verschiedenen Ausschleuderungsstadien, wie sie von SCHMIDT (19) mit Erfolg an den Spindeltrichocysten durchgeführt wurde, könnte ebenfalls neue Gesichtspunkte ergeben.

Zusammenfassung

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß Protrichocysten, Spindeltrichocysten und Nesselkapseltrichocysten im sublichtmikroskopischen Aufbau recht verschieden sind und daher nicht zusammengefalt als primitive Tektinausscheidungen bezeichnet werden dürfen. Da es sich auch funktionell um hochspezialisierte Organelle handelt, besitzen sie nur das unwesentliche gemeinsame Merkmal, nach einer Reizung der Zelle zur Ausscheidung zu gelangen. Bei den Protrichocysten ist damit eine Quellung verbunden, an den Spindeltrichocysten läuft ein geordneter Streckungsprozeß ab, während die Nesselkapseltrichocysten wahrscheinlich einen Streckungs-, Umstülpungs- und Ausschachtelungsprozeß zeigen.

Um Aussagen über phylogenetische Beziehungen dieser Organelle untereinander machen zu können, bedarf es der Untersuchung vorhandener Zwischenformen. Weitere vergleichende Untersuchungen an Nesselkapseltrichocysten, die bei fast allen gymnostomen Ciliaten mit Ausnahme der Hypostomata vorkommen, werden systematische Bedeutung gewinnen, wenn zur Untersuchung Populationen herangezogen werden können, die nur aus einer Art bestehen.

Herr Prof. Dr. Fr. KRÜGER, Münster, förderte in dankenswerter Weise unsere Untersuchungen durch außerordentlich wertvolle Ratschläge und Anregungen. Den Direktoren des Zoologischen und des Hygiene-Instituts, Herrn Prof. Dr. B. RENSCH und Herrn Prof. Dr. K. W. JÖTTEN, danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten seitens der Institute. Von dem einen von uns (WOHLFARTH-BOTTERMANN) wurde vorliegende Arbeit im Rahmen eines Forschungsstipendiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Sämtliche Bilder erzielten wir mit einem AEG-ZEISS-Gerät in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Hygiene-Institut der Univ. Münster i. W.

Schrifttum

- 1) KRÜGER, FR., Arch. Protkde. **83**, p. 275—320 (1934).
- 2) KRÜGER, FR., Zoologica **34**, H. 91 (1936).
- 3) JAKUS, M. A., J. exp. Zool. **100** No. 3, p. 457—485 (1945).
- 4) JAKUS, M. A., and C. E. HALL, Biol. Bull. **91**, No. 2, p. 141—144 (1946).
- 5) PEASE, D. C., J. cellul. a. comp. Physiol. **29**, p. 91—94 (1947).
- 6) WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., Naturwiss. **37**, H. 24, p. 562—563 (1950).
- 7) WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., Arch. Protkde. **98** (1952).
- 8) LEHMENSICK, R., Tagung Dtsch. Ges. Elektr. Mikr. Hamburg 1951.
- 9) BEYERSDORFER, K., Z. f. Naturf. **6b**, H. 2, p. 57—60 (1951).
- 10) KNOCH, M., und H. KÖNIG, Naturwiss. **38**, H. 22, p. 531 (1951).
- 11) KRÜGER, FR., und K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, Mikroskopie **7**, H. 3/4, p. 121 bis 130 (1952).
- 12) WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., und G. PFEFFERKORN, Umschau H. 4 (1952).
- 13) KRÜGER, FR., K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN und G. PFEFFERKORN, Z. f. Naturf. **7b**, H. 7, p. 407—410 (1952).
- 14) KAHL, A., Arch. Protkde. **60**, p. 34—128 (1927).
- 15) KAHL, A., Ciliata in F. DAHL, Tierwelt, Jena 1930.
- 16) BRESSLAU, E., Naturwiss. **9**, p. 57—62 (1921).
- 17) SCHNEIDER, W., Arch. Protkde. **72**, p. 482—537 (1930).
- 18) KLEIN, B. M., Arch. Protkde. **65**, p. 183—275 (1929).
- 19) SCHMIDT, W. J., Arch. Protkde. **92**, H. 3, p. 527—536 (1939).

[Eingegangen: 6. 1. 1952]

Zuschriftenwechsel

Photogrammetrische Ausmessung elektronenmikroskopischer Stereobilder.

Zu dem gleichnamigen Beitrag von J.-G. HELMCKE und H. RICHTER in Heft 3/4 (1951).

In der genannten Arbeit, die in an sich dankenswerter Weise auf die vielen Möglichkeiten der stereophotogrammetrischen Auswertung von elektronenmikroskopischen Bildern aufmerksam macht, wird u. a. behauptet, daß die von mir durchgeführte Ausmessung mit dem Stereokomparator „das einzig richtige Ergebnis verfehlen mußte“, daß eine einwandfreie Auswertung nur möglich sei, wenn durch richtige innere und äußere Orientierung der Bilder ein unverzerrtes optisches Modell hergestellt würde, und daß Stereoplanigraph und Aeroprojektor Multiplex hierfür geeignete Geräte seien.

Hierzu habe ich folgendes zu bemerken: Als ich 1940 im Institut für Photogrammetrie der T. H. Berlin (Leiter Prof. Dr. LACMANN) die erste elektronenmikroskopische Stereomessung durchführte, standen mir u. a. auch die oben erwähnten Geräte zur Verfügung. Wenn ich damals trotzdem auf die Parallaxenmessung mit dem Stereokomparator zurückgriff, geschah dies also nicht in Ermangelung eines besseren Hilfsmittels. Maßgebend für die Wahl des Verfahrens war vielmehr die Erkenntnis, daß bei der Ausmessung elektronenmikroskopischer Bilder wesentlich andere Verhältnisse vorliegen als bei der von üblichen Meßbildern (Luftbildern) und daß die Ausmessung mit dem Stereokomparator unter diesen Umständen einwandfreiere Ergebnisse liefern muß als die mit dem Stereoplanigraphen oder dem Aeroprojektor Multiplex, da die Forderung auf Rekonstruktion des Aufnahmestrahlangangs von elektronenmikroskopischen Bildern nur nach grundlegender Änderung der Konstruktion dieser Geräte zu verwirklichen wäre. Damit soll nicht bestritten werden, daß mit ihnen unter Umständen eine für die praktischen Bedürfnisse genügend genaue Auswertung durchführbar ist und Aufgaben lösbar sind, deren Bearbeitung mit dem Stereokomparator Schwierigkeiten bereitet (Zeichnen von Schichtlinienplänen). Es darf aber nicht der Anspruch erhoben werden, daß die so erzielten Ergebnisse die einwandfreieren seien.

Zusammenfassend ist festzustellen:

1. Die Parallaxenmessung mit dem Stereokomparator hat nicht, wie behauptet, das einzig richtige Ergebnis verfehlt, sondern stellte nach gewissenhafter, wissenschaftlicher Prüfung aller in Betracht kommenden Lösungswege das bestmögliche Verfahren dar.
2. Mit den in dem Artikel genannten Auswertgeräten ist kein unverzerrtes optisches Raummodell von elektronenmikroskopischen Objekten herstellbar; sie liefern bestenfalls Näherungslösungen.

E. Gotthardt

Antwort auf die vorstehende Entgegnung von E. Gotthardt

Photogrammetrische Ausmessung elektronenmikroskopischer Stereobilder.

Von J.-G. HELMCKE und H. RICHTER.

Zu der Entgegnung von GOTTHARDT auf unseren gleichnamigen Beitrag (Heft 3/4) können wir auf Grund unserer umfangreichen praktischen Erfahrung erwidern, daß die photogrammetrische Ausmessung elektronenmikroskopischer Stereobilder mit den heutigen technischen Mitteln sowohl der verbesserten Aufnahmetechnik als auch des neuen Ausmeßgerätes sich den wirklichen Werten weit stärker nähert, als sie GOTTHARDT und anderen Autoren unter Verwendung der Parallaxenmessung im Stereokomparator vor zehn Jahren möglich war. Wir können dies damit begründen, daß

1. der Stereokomparator, den GOTTHARDT verwendete, für den Normalfall der Stereophotogrammetrie (parallele Plattenlage) gebaut ist und
2. die Meßergebnisse, die dieses Gerät liefert, Koordinatenwerte einzelner Punkte darstellen.

In der Elektronenphotogrammetrie liegt nun nicht der Normalfall vor, vielmehr haben wir es mit einer windschiefen Plattenlage zu tun. In erster Linie sind es konvergente Aufnahmen mit einem bestimmten Konvergenz-Soll-Winkel. Dieser am Aufnahmegerät eingestellte Winkel ist meistens, wie sich aus einer großen Anzahl von Ausmessungen ergeben hat, unbestimmt und differiert bis $\pm 2^\circ$. Die bisherigen Ausmessungen haben außerdem ergeben, daß mit einer Querneigung gerechnet werden muß, deren Größe im Mittel ungefähr $0,5$ bis $0,7^\circ$ beträgt. Dazu kommt eine Maßstabdifferenz zwischen den beiden Teilbildern, deren Größe verschieden ist und von der Sorgfalt bei der Aufnahme abhängt. Auch hier hat die Erfahrung ergeben, daß diese Differenz bei normalen Aufnahmen trotz besonderer Aufmerksamkeit mindestens $1-2\%$ beträgt.

Es ist selbstverständlich, daß auch derartige Aufnahmen im Stereokomparator ausgemessen werden können, jedoch nicht unter Berücksichtigung der aufgezählten Abweichungen von dem Normalfall der Stereophotogrammetrie. Eine oberflächliche Orientierung über den plastischen Eindruck eines solchen Stereobildpaares mag wohl genügen; will man jedoch auf größtmögliche Genauigkeit Wert legen, so dürfen diese Abweichungen nicht vernachlässigt werden. Die Verzerrungen, die sich hieraus ergeben, sind immerhin so groß, daß sie sich bei der raumrichtigen Darstellung bemerkbar machen.

Die oben aufgeführten Zahlenangaben haben wir von Ausmessungsreihen vieler Hunderter von Stereobildpaaren gewonnen. Wir müssen jedoch annehmen, daß im Jahre 1940, als GOTTHARDT seine Ausmessungen durchführte, die Anfertigung von stereoskopischen Aufnahmen längst nicht so exakt war, wie es heute auf Grund der verbesserten Technik möglich ist. So ist für uns jetzt manches selbstverständlich, was damals H. O. MÜLLER noch Schwierigkeiten bereitet hat. Erinnern möchten wir daran, daß er erst während seiner Arbeit den gebräuchlichen Stereokopf entwickelt hat, der inzwischen noch weiter verbessert worden ist.

Die Herstellung von einwandfreien Stereoaufnahmen ist heute einfach und unkompliziert, während H. O. MÜLLER noch viel Mühe aufwenden mußte, um für die Ausmessung brauchbare Bilder zu bekommen. Wir können daher annehmen, daß für eine raumrichtige Ausmessung der damaligen Aufnahmen wegen der größeren Fehlerquelle und Unsicherheit der Orientierungswerte die Anwendung eines entsprechenden Ausmessungsgerätes, das auch eine innere Orientierung der Bilder ermöglicht hätte, besonders notwendig gewesen wäre.

Die Auswertung der Aufnahmen im Stereo-Komparator hat den folgenden Aufwand zur Voraussetzung:

1. Photogrammetrisch-wissenschaftlich vorgebildete Spezialkräfte, die die Umrechnung der Messungen vornehmen können.
2. Stereokomparator.
3. Doppelrechenmaschine (z. B. Thales Geo).
4. Die genauen Werte der gegenseitigen Lage von Teilbildern zueinander (Konvergenzwinkel, Querneigung, Maßstabfehler) und die Lage des Stereogramms zu der gewünschten Bezugsebene.

Die Voraussetzungen 1 bis 3 müssen bekannt sein und waren damals hinreichend erfüllt, dagegen sind auch heute noch die Angaben zu Punkt 4 im Stereokomparator nur mit der vorn angegebenen Unsicherheit zu bekommen, die vor zehn Jahren eher noch größer gewesen sein dürfte als heute. Da weder in den Arbeiten von GOTTHARDT noch in denen anderer Autoren, die mit dem Komparator arbeiteten, Angaben darüber enthalten sind, wie die Forderungen des Punktes 4 erfüllt worden sind, müssen wir folgern, daß die elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Stereokomparator unter der stillschweigenden Voraussetzung ausgemessen wurden, als läge der Normalfall der Stereophotogrammetrie (Parallele Plattenlage) vor, d. h. es sei nur der Soll-Konvergenzwinkel als richtig angenommen worden. Die Ausmessung im Stereokomparator kann also für die in Punkt 4 geforderten Bedingungen nur mit angenommenen Werten arbeiten. Wir wissen heute, daß die Sollwerte um die genannten Beträge unsicher sind, und deshalb kann die Stereokomparatormessung auch nicht das richtige Ergebnis erreichen trotz des großen und komplizierten Aufwandes an rechnerischer Arbeit.

Außer dieser Unsicherheit in der raumrichtigen Darstellung sollte in diesem Zusammenhange auch das offensichtliche Nachteil der Komparatormethode bei der praktischen Anwendung

der Ausmessung elektronenmikroskopischer Stereobildpaare gedacht werden; denn alle Berechnungen ergeben nur Punktkoordinaten, die durch subjektive Betrachtung des Stereobildes zu dem gewünschten Ergebnis (Schichtlinien, Schnitte) ergänzt werden müssen. In den von uns verwendeten Stereoausmeßgeräten wird dagegen optisch-mechanisch und ohne Rechenarbeit lediglich durch „Orientierungen“ der beiden Aufnahmen gegeneinander, sowie des virtuellen Modells in einer gewünschten Bezugsebene das verlangte Ausmeßergebnis mit größtmöglicher Genauigkeit erreicht. Im Gegensatz zu der Benutzung des Stereokomparators kann die Ausmessung in dem von uns verwendeten Stereomeßgerät durch technische Assistenten ohne Beteiligung von Wissenschaftlern der Photogrammetrie durchgeführt werden. Sie erfordert überhaupt keine Rechenarbeiten und liefert unter hoher Sorgfalt automatisch das richtige Ergebnis. Erforderlich ist jedoch ein entsprechendes Stereoausmeßgerät.

Wir würdigen die Arbeit von GOTTHARDT trotz der Meinungsverschiedenheiten als eine der Erstarbeiten, und wir bedauern, daß die damals von ihm mit H. O. MÜLLER begonnene Arbeit durch die zeitbedingten Schwierigkeiten und durch den Tod MÜLLERS unterbrochen worden ist.

Klarstellung

Von E. GOTTHARDT

Daß die Auswertung elektronenmikroskopischer Stereobilder mit photogrammetrischen Universalauswertgeräten bequemer und einfacher durchführbar ist als mit dem Stereokomparator und insbesondere bei der Darstellung eines Objektes in Schichtlinien und Schnitten eine Reihe gewichtiger Vorzüge aufweist, wurde von mir nicht bestritten.

Zur Erörterung stand lediglich die Frage, ob die Auswertung mit dem Stereokomparator „das einzig richtige Ergebnis verfehlt“ hat. Zu ihrer Beantwortung ist davon auszugehen, daß zur richtigen Auswertung die objektseitigen Strahlenkegel wieder rekonstruiert werden müssen. Diese abbildenden Strahlenkegel haben bei der Luftbildmessung ein Verhältnis

Durchmesser — von etwa 1:1 (Abb. 1), bei der Elektronenmikroskopie ein solches von etwa

Höhe — (Abb. 2). Derart schlanke Strahlenkegel lassen sich nun mit keinem bekannten Auswertgerät auch nur annähernd rekonstruieren, wohl aber mit guter Genauigkeit durch Parallelprojektionen ersetzen, wie dies bei den Stereokomparatormessungen rechnerisch durchgeführt wurde. Die hierbei angewandten Formeln waren durchaus nicht die des Normalfalls, sondern den besonderen Verhältnissen entsprechende. Es ist daher auch ganz unerheblich, daß der Stereokomparator ursprünglich nicht für diese Aufgabe, sondern für die Auswertung von

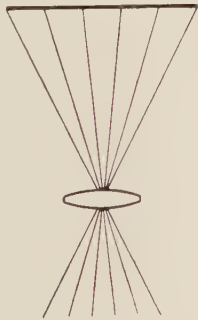


Abb. 1. Abbildender Strahlenkegel bei der Luftbildmessung $\frac{\text{Durchmesser}}{\text{Höhe}} = 1 : 1$



Abb. 2. Abbildender Strahlenkegel bei der Elektronenmikroskopie $\frac{\text{Durchmesser}}{\text{Höhe}} = 1 : 100$

Normalaufnahmen bestimmt war. Die im Gegensatz zu der Ansicht der Herren HELMCKE und RICHTER sehr einfachen und leicht anwendbaren Formeln sind in den Arbeiten von H. O. MÜLLER und mir abgeleitet und angegeben worden. Eine Berücksichtigung von Maßstabsdifferenzen war dabei nicht erforderlich, da solche durch vorheriges Vergrößern oder Verkleinern der Bilder leicht ausgeschaltet werden können.

Weiter wird den Komparatormessungen vorgeworfen, daß bei ihnen Abweichungen vom beabsichtigten Konvergenzwinkel und Querneigungsdifferenzen nicht festgestellt und berücksichtigt werden könnten, während dies im Universalgerät ohne weiteres möglich sei. Letzteres trifft jedoch nicht zu. Die weitgehende Annäherung des objektseitigen Strahlengangs im Elektronenmikroskop an die Parallelprojektion hat nämlich zur Folge, daß die gegenseitige Orientierung zweier solcher Strahlenkegel um etwa zwei Zehnerpotenzen unsicherer wird als die von Luftbildpaaren. Längs- und Querneigungsdifferenz und damit auch der Konvergenzwinkel können daher aus dem Bildinhalt nur mit Fehlern von mehreren Graden, d. h. praktisch überhaupt nicht, abgeleitet werden. Bei richtiger Wiederherstellung des Strahlengangs versagt die gegenseitige Orientierung völlig.

Diese auf die mathematischen Gegebenheiten gegründete und damit ausnahmslos gültige Feststellung steht zunächst im Widerspruch zu den Angaben der Herren HELMCKE und RICHTER, die noch Querneigungsdifferenzen von weniger als 1° festgestellt haben wollen. Er löst sich jedoch, wenn man beachtet, daß die richtigen objektseitigen Strahlenkegel mit den üblichen Auswertgeräten nicht darstellbar sind, und annimmt¹⁾, daß bei der Auswertung die richtigen Strahlenkegel nach Abb. 2 durch weitgeöffnete nach Abb. 1 ersetzt worden sind. Dann ist freilich scheinbar eine sichere gegenseitige Orientierung möglich. Tatsächlich wird dabei aber nur die Folge des ersten Fehlers, der Benutzung eines falschen Strahlengangs, als Aufnahmefehler gedeutet und durch eine Änderung der Querneigung und Konvergenz bezüglich gewisser Symptome (Parallaxenfreiheit) kompensiert. Hinsichtlich der Form des optischen Raummodells wirken sich beide Fehler jedoch verschieden aus, so daß dieses in schwer zu überblickender Weise deformiert wird. Auch eine etwa vorangehende Entzerrung der Bilder vermag diesen Fehler nur zu mildern, aber nicht zu beseitigen.

Weitere Modelldeformationen ergeben sich aus den Verzeichnungsfehlern der Elektronenoptik, die bei einer solchen „gegenseitigen Orientierung“ ebenfalls durch Konvergenzänderungen und Querneigungsdifferenzen kompensiert werden.

Im Gegensatz zur Luftbildmessung ist die gegenseitige Orientierung bei elektronenmikroskopischen Bildern daher zur Feststellung von Aufnahmefehlern gänzlich unbrauchbar, und jeder Versuch, die Aufnahmedaten auf diesem Wege zu verbessern, vermehrt die Fehler, statt sie zu verringern. Unter diesen Umständen ist der bei der Aufnahme eingestellte Wert des Konvergenzwinkels tatsächlich der zuverlässigste und die Auswertung mit dem Stereokomparator unter Rückgriff auf diesen Wert trotz ihrer scheinbaren Primitivität die einwandfreieste.

¹⁾ Über die Einzelheiten des angewandten Verfahrens wurde bisher keine Auskunft erteilt.

Schrifttum der Elektronenmikroskopie

(4. Folge)

Herausgegeben von **B. v. Borries** und **H. Ruska**

G. Untersuchungstechnik der Übermikroskopie

G 1. Allgemeines und Übersichten, Eichung der Instrumente

1514. *Wood, R. W.*: Improved diffraction gratings and replica. *J. opt. Soc. America* 34, 592 (1944).
1515. *Westinghouse*: Quartz filaments for electron microscope calibration. *Science* 99, Suppl., S. 10 (1944).
1516. *Heidenreich, R. D.*: Techniques in applied electron microscopy. *J. opt. Soc. America* 35, 139 (1945).
1517. *Jacobsen, A. E.*, und *Sullivan, W. F.*: Centrifugal sedimental method for particles size distribution. *Ind. Eng. Chem.* 18, 360—364 (1946).
1518. *Frimer, D. J.*, und *Pupko, S. L.*: Untersuchungsmethoden in der Elektronenmikroskopie. Betriebslabor. UdSSR, Nr. 11, 1917.
1519. *Fullam, E. F.*: Measuring by electron microscopy. *Gen. electr. Rev.* 50, 18 (1947).
1520. *Robillard, J.*: La préparation des spécimens pour le microscope électronique. *Cie. Gén. de Télégraphie Sans Fil*, Paris, 1948.
1521. *Scott, G. D.*: Spherical particles for electron microscopy. *J. appl. Phys.* 20, 417—418 (1949).
1522. *Cosslett, V. E.*: Magnification calibration: the use of latex particles and alternative methods. *Proc. Conf. Electr. Microscopy*, Delft Juli 1949, 64—66 (1950).
1523. *Drummond, D. G.*: Specimen techniques. *Proc. Conf. Electr. Microscopy*, Delft, Juli 1949, 94—98 (1950).
1524. *Pease, R. S.*: The determination of electron microscope magnification. *J. Sci. Instruments* 27, 182—186 (1950).
1525. *Yudowitch, K. L.*: Latex particle size from x-ray diffraction peaks. *J. appl. Phys.* 22, 214 (1951).
1526. *Ellis, S. G.*: Specimen charging in the electron microscope and some observations on the size of polystyrene latex particles. *J. appl. Phys.* 23, 728—732 (1952).
1527. *Hyam, E. D.*, und *Nutting, J.*: A method for the electron and optical microscopic examination of identical areas. *Brit. J. appl. Phys.* 3, 173—176 (1952).
1528. *Watson, J. H. L.*, und *Gruke, W. L.*: The reliability of internal standards for calibrating electron microscopes. *J. appl. Phys.* 23, 793—798 (1952).

G 2. Präparation von Durchstrahlungspräparaten

1529. *Boettcher, A.*: Herstellung temperaturbeständiger Trägerfolien für die Bestimmung von Gitterkonstanten metallischer Mehrstoffsysteme mittels Elektroneninterferenzen. *Kolloid-Z.* 100, 228—230 (1942).
1530. *Wirth, J.*: Methode zur Ablagerung von plastischen Membranen auf elektronenmikroskopische Trägernetze und ihre Anwendung auf die Untersuchung von Gewebekulturen. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 225, 899 (1947).
1531. *Vanamee, P.*: The preparation of tissues for electron microscopy. *Med. Div. Rept.* 209, 39 (1949).
1532. *Frey, M.*: Elektronenmikroskopische Technik der Verteilung von Kristallen auf einem Objektträger durch Dekantieren in der Luft. *Bull. Soc. chim. France Mém.* 5, 17, 1064 (1950).
1533. *Dalle Nogare, G.*: Un metodo di preparazione di provini di pigmenti per microscopia elettronica. *La Chimica e l'Industria* 33, 546—548 (1951).
1534. *Davoine, F.*, und *Pernoux, E.*: Sur l'emploi des caoutchoucs chlorés comme films-supports d'objets en microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 233, 1590 (1951).
1535. *Dent, R. F.*, *Barhite, N.*, und *Geever, E. F.*: Technical problems in direct

- tissue studies with the electron microscope. *J. of Clinic. Pathol.* 21, 836—841 (1951).
1536. *Dessens, H.*, und *Ch. Fert*: Grilles supports en fils d'araignée pour microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 232, 606—608 (1951).
1537. *Geever, E. F.*, *Dent, R. F.*, und *Barhite, N.*: The moment status of the electron microscope in thin tissue studies. *Rocky Mt. Med. J.* 48, 99—101 (1951).
1538. *Helmcke, J.-G.*: Licht- und elektronenmikroskopische Abbildungen biologischer Objekte in hochpolymeren Einbettungsmitteln. *Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Techn.* 60, 101—102 (1951).
1539. *König, H.*: Elektronenoptische Präparationsverfahren für Feinstäube und Untersuchungsergebnisse. *Z. VDI* 93, 1122 (1951).
1540. *Schofield, F.*: A new method of preparing paste and powder specimens for the electron microscope. *Brit. J. appl. Phys.* 2, 18—19 (1951).
1541. *Dalton, A. J.*: Preparation of tissues for study under the electron microscope, some results obtained on epithelial cell types in the digestive tract and kidney. *Lab. Invest.* 1, 46—49 (1952).
1542. *Palade, G. E.*: A study of fixation for electron microscopy. *J. exper. Med.* 95, 285—298 (1952).
1543. *de Souza Santos, P.*, und *Lopes, H. B.*: A method of preparing crystals that undergo changes under electron bombardment in an electron microscope. *Nature* 169, 498—499 (1952).
- G 2 a. Mikrotomie**
1544. *Heard, O. O.*: Microtomy with a reciprocating circular knife and a mechanism for sharpening the knife. *Rev. Sci. Instruments* 17, 227—232 (1946).
1545. *O'Brien, H. C.*, und *McBain, J. W.*: Thin undistorted sections for electron microscopy. *J. A. Chem. Soc.* 68, 1139 (1946).
1546. *O'Brien, H. C.*: Thin section methods for the electron microscopic examination of cured polymers. *J. appl. Phys.* 17, 407 (1946).
1547. *Claude, A.*: Camphor-naphtalene eutectic mixture used to embed tissue sections; cut at $\frac{1}{10} \mu$ and mixture sublimed out. *Rotary microtome-50,000 r. p. m.* *Proc. Intern. Cytol. Congress.*, Stockholm 1947.
1548. *Baker, R. F.*, und *Pease, D. C.*: Sectioning techniques for the electron microscope using a conventional microtome. *J. appl. Phys.* 19, 1189, 1948.
1549. *Grey, C. E.*: Microtome for electron microscopy. *Interchem. Rev.* 7, 26—29 (1948).
1550. *Newman, S. B.*, *Borysko, E.*, und *Swerdlow, M.*: New method for microsectioning. *Anatom. Rec.* 105, 267—271 (1949).
1551. *Newman, S. B.*, *Borysko, E.*, und *Swerdlow, M.*: NBS method for microsectioning. *Nat. Bur. Stand. Techn. Rept.* 1358 (1949).
1552. *Baud, C. A.*: La forme des espaces submicroscopiques. *Proc. Conf. Electron Microscopy Delft Juli 1949*, S. 111—112 (1950).
1553. *Bretschneider, L. H.*: Microtome sections of animal tissues. *Proceedings of the Conference on Electron Microscopy Delft, Juli 1949*, S. 104—106 (1950).
1554. *Eden, M.*, *Pratt, A. W.*, und *Kahler, H.*: A microtome specimen holder advanced by thermal expansion. *Rev. sci. Instruments* 21, 802—804 (1950).
1555. *Latta, H.*, und *Hartmann, J. F.*: Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. *Proc. Soc. exp. Biology and Medicine* 74, 436—438 (1950).
1556. *Richards, O. W.*: Microtome knife sharpness. *Rev. sci. Instruments* 21, 670 (1950).
1557. *Bernhard, W.*, und *Gautier, A.*: Le développement des méthodes de coupes ultra-fines pour le microscope électronique et leur application à l'étude du cancer. *Bull. Cancer* 38, 294—301 (1951).
1558. *Finley, H. E.*: Electron microscopy of thin-sectioned spirostomum. *Science* 113, 362 (1951).
1559. *Flewett, T. H.*, und *Challice, C. E.*: The cutting of sections for electron microscopy, using ester wax as an embedding medium. *Journ. Pathology and Bacteriology* 63, 748—751 (1951).
1560. *Geren, B. B.*, und *McCulloch, D.*: Development and use of the Minotaur rotatory microtome for thin sectioning. *Expt. Cell Research* 2, 97—102 (1951).
1561. *Hillier, J.*: On the sharpening of microtome knives for ultra-thin sectioning. *Rev. sci. Instruments* 22, 185—188 (1951).
1562. *Sjöstrand, F.*: A method for making ultra-thin tissue sections for electron microscopy at high resolution. *Nature* 168, 646 (1951).

1563. *Anonym*: Microtome for electron microscope. Chem. & Eng. News 30, 1802 (1952).
 1564. *Baker, R. F.*, und *Warren, O.*: Simplified embedding of biological material for thin sectioning. Nature 169, 420 bis 421 (1952).
 1565. *Fernández-Morán, H.*: Application of the ultrathin freezing-sectioning technique to the study of cell structures with the electron microscope. Ark. Fys. 4, 471—483 (1952).
- ### G 3. Abdruckverfahren
1566. *Matheson, L. A.*, und *Heidenreich, R. D.*: Polystyrene aids the electron microscope. Mod. Plas. 124 (1943).
 1567. *Nicoll, F. H.*, und *Baker, R. F.*: On the silica replica method of surface examination by the electron microscope. J. appl. Phys. 15, 803 (1944).
 1568. *McDill, R. D.*, *Williams, R. C.*, und *Wyckoff, R. W. G.*: Flax film. J. appl. Phys. 17, 25 (1946).
 1569. *Phelps, R. T.*, *Gulbrandsen, E. A.*, und *Hickman, J. W.*: Electron diffraction and electron microscope study of oxide films formed on metals and alloys at moderate temperatures; stripped oxide films of metals. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18, 391—400 (1946).
 1570. *Scott, R. A.*: Electron replicas of ground sections through teeth. Public Health Reports 62, 422—425 (1947).
 1571. *Scott, D. B.*, und *Wyckoff, R. W. G.*: Electron microscopy of tooth structure by the shadowed collodion replica method. U.S. Pub. Health Rep. 62, 1513 (1947).
 1572. *Calbick, C. J.*: The range of migration of silica molecules in the formation of silica replicas. J. appl. Phys. 19, 119 (1948).
 1573. *Claude, A.*: Studies of cells and tissues by the method of replicas. J. appl. Phys. 19, 126 (1948).
 1574. *Comer, J. J.*, und *Hamm, F. A.*: An evaluation of several types of replicas. J. appl. Phys. 19, 1186 (1948).
 1575. *Heinmets, F.*: Modified silica replica technique for study of biological membranes and rotary shadow casting of specimens. J. appl. Phys. 19, 119 (1948).
 1576. *Kellenberger, E.*: Neue Abdruckmethode für die Elektronenmikroskopie (in französisch). Experientia 4, 449 (1948).
 1577. *Pearson, J.*, und *Hopkins, M. R.*: Plastic replicas for surface-finish measurement. J. Iron and Steel Inst. 158, 138 (1948).
 1578. *Claude, A.*: Electron microscope studies of cells by the method of replicas. J. Exper. Med. 89, 425—429 (1949).
 1579. *Schwartz, C. M.*, *Austin, A. E.*, und *Weber, P. H.*: A positive-replica technique for electron microscope. J. Appl. Phys. 20, 202—205 (1949).
 1580. *Baud, C. A.*: La forme des espaces sub-microscopiques. Proc. Conf. Electron Microscopy, Delft Juli 1949, S. 111 bis 112 (1950).
 1581. *Dohnalek, R.*, und *Vesely, S.*: Die Elektronenmikroskopie von Abdrücken (tschechisch). Časopis pro Pestovani Matematiky a Fysiky 75, D 9 (1950).
 1582. *Helwig, G.*, und *König, H.*: Die Kathodenzerstäubung, ein Hilfsmittel zur Untersuchung übermikroskopischer Objekte. Optik 7, 294—302 (1950).
 1583. *Kellenberger, E.*: New methods for biological replicas. Proceedings of the Conference on Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 101—103 (1950).
 1584. *Makinson, K. R.*: Abdruckverfahren zur Elektronenmikroskopie der Oberfläche von Wollschachen. Textile Res. J. 20, 22—28 (1950).
 1585. *Nutting, J.*, und *Cosslett, V. E.*: The dry-stripping of formvar replicas from etched metal surfaces. Inst. Metals Monograph no. 8, 65—74 (1950).
 1586. *Seeliger, R.*: Sind Oberflächenabdrücke formtreu? Optik 7, 303—309 (1950).
 1587. *Semljanowa, L. S.*, *Kuschnir, Ju. M.*, und *Frimer, A. I.*: Einstufige Quarzabdrücke für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Dokl. Akad. Wiss. UdSSR 70, 991 (1950).
 1588. *Agar, A. W.*: Replica techniques in electron microscopy. British J. appl. Phys. 2, 8—11 (1951).
 1589. *Austin, A. E.*, und *Schwartz, C. M.*: Modification of a positive-replica technique for electron microscopy. J. Appl. Phys. 22, 847—848 (1951).
 1590. *Calbick, C. J.*: Inorganic replication in electron microscopy. Bell Syst. Tech. J. 30, 798—824 (1951).
 1591. *Craig, W. J.*: Preparation of replicas for electron metallography. Metal Progress 60, 68—71 (1951).
 1592. *McCartney, J. T.*, und *Anderson, R. B.*: Electron microscopic replica studies of porosity in fused iron catalysts. J. appl. Phys. 22, 1441—1443 (1951).
 1593. *Mennenöh, S.*, und *Fahnenbrock, M.*: Über das Polymerisationsabdruckverfahren in der Übermikroskopie. Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Techn. 60, 203—211 (1951).

1594. *Mennenöh, S.* und *Fahnenbrock, M.*: Über elektronenmikroskopische Abbildung lebender Zähne mit Hilfe des Polymerisationsabdruckverfahrens. *Kolloid-Z.* 121, 155—157 (1951).
1595. *Mennenöh, S.*: Die elektronenmikroskopische Abbildung von Kohleoberflächen mit Hilfe des Polymerisationsabdruckverfahrens. *Bergbau-Archiv* 12, 87—98 (1951).
1596. *Palatnik, L. S.*: Al-Polystyrol-Methode zur Untersuchung von Legierungen im Elektronenmikroskop. *Isvestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie* 15, 373 bis 382 (1951).
1597. *Trillat, J.-J.*, und *Besse, M.*: Sur l'étude des états de surface des tissus au moyen de répliques. *C. Acad. Sci. Paris* 232, 608—610 (1951).
1598. *Yamaguchi, Sh.*: Structure of oxide replicas for electron microscopy. *J. appl. Phys.* 22, 1295 (1951).
1599. *Dalitz, V. Ch.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Metalloberflächen. *Metallen* 7, No. 9, 3—11 (1952).
1600. *Yamaguchi, Sh.*: Structure of oxide replicas for electron microscopy. *J. appl. Phys.* 23, 445—447 (1952).
1608. *Williams, R. C.*, und *Backus, R. C.*: The electron-micrographic structure of shadow-cast films and surfaces. *J. appl. Phys.* 20, 98—106 (1949).
1609. *Helwig, G.*, und *König, H.*: Die Kathodenzerstäubung, ein Hilfsmittel zur Untersuchung übermikroskopischer Objekte. *Optik* 7, 294—302 (1950).
1610. *Levaditi, J. C.*, *Lépine, P.*, *Giuntini, J.*, und *Croissant, O.*: Modifications apportées par ombrage métallique à l'aspect des coupes histologiques observées à l'aide de la microscopie en lumière blanche ou de la microscopie en fluorescence. *Ann. Institut Pasteur* 78, 545 bis 548 (1950).
1611. *Nieuwenhuijs, J. A.*: Shadow casting. *Proceedings of the Conference on Electron Microscopy Delft, Juli 1949*, 49—51 (1950).
1612. *Barnes, W. H.*, und *Lambe, M. S.*: Shadow-casting with halides in the electron microscope. *Canad. J. Phys.* 29, 491—494 (1951).
1613. *Philpott, D. E.*: Portrait shadow-casting. *J. appl. Phys.* 22, 982—983 (1951).
1614. *Fisher, R. M.*: Direct printing of shadowed electron micrographs. *J. appl. Phys.* 23, 153—154 (1952).

G 4. Bedampfungsverfahren

1601. *Olsen, L. O.*, *Smith, C. S.*, und *Crittenden, E. C. Jr.*: Techniques for evaporation of metals. *J. appl. Phys.* 16, 425—434 (1945).
02. *Anderson, T. F.*: The shadow-casting technique in electron microscopy. *J. Bact.* 51, 563 (1946).
1603. *Skilling, W. T.*: Gold shadowing in electron microscopy. *Sci. Monthly* 62, 559—561 (1946).
1604. *Scott, D. B.*, und *Wyckoff, R. W. G.*: Electron microscopy of tooth structure by the shadowed collodion method. *U.S. Pub. Health Rep.* 62, 1513 (1947).
1605. *Wertner, W. N.*: Eine einfache Methode der Beschattung im Elektronenmikroskop. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR* 58, 1031 (1947).
1606. *Heinmets, F.*: Modified silica replica technique for study of biological membranes and rotary shadow casting of specimens. *J. appl. Phys.* 19, 119 (1948).
1607. *Locquin, M.*, und *Bessis, M.*: Amélioration des images observées avec la technique de l'ombrage par l'examen au contraste de phase. *C. R. Séanc. Biol. Séance du 11 Déc. 1948*, 142, 1947 (1948).

G 5. Sonstige Präparationsverfahren

1615. *Anderson, T. F.*: The use of critical point phenomena in preparing specimens for the electron microscope. *J. appl. Phys.* 21, 724 (1950).
1616. *Weil, R.*, und *Read, H. J.*: Electron-microradiography of electrodeposited metals. *J. appl. Phys.* 21, 1068 (1950).
1617. *Anderson, T. F.*: Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron-microscope. *Trans. New York Acad. Sciences* 13, 130—134 (1951).
1618. *Bromberg, A. W.*, *Lukjanowitsch, W. M.*, *Nemzowa, W. W.*, *Raduschkewitsch, L. W.*, und *Tschmutow, K. W.*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Feinstruktur durch ein Entwicklungsverfahren. *Doklady Akad. Wiss. UdSSR* 79, 827—830 (1951).
1619. *Helmcke, J.-G.*: Licht- und elektronenmikroskopische Abbildungen biologischer Objekte in hochpolymeren Einbettungsmitteln. *Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Techn.* 60, 101—102 (1951).
1620. *Anderson, T. F.*: Stereoscopic studies of cells and viruses in the electron microscope. *The American Naturalist* 86, 91—100 (1952).

1621. *Yamaguchi, Sh.*: A note on „Electron microradiography of electro-deposited metals“. J. appl. Phys. 23, 288—289 (1952).

G 6. Apparative Ausrüstung des übermikroskopischen Laboratoriums

1622. *Grün, L., und Tischer, W.*: Ein einfaches Gerät für die Herstellung von Abklatschpräparaten zur elektronenmikroskopischen Untersuchung. Optik 6, 129—132 (1950).
1623. *Wolff, O.*: Einfaches Ultraschallgerät zur Schallbehandlung kleiner Mengen. Optik 7, 311 (1950).
1624. *Boersch, H.*: Ein Hochvakuum-Pumpstand für das Laboratorium. Z. f. Physik 130, 513—516 (1951).
1625. *Frimer, A. I., und Nefedow, A. K.*: Anlage zur elektronenmikroskopischen Präparierung (WUP-1). Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physikal. Serie 15, 336 (1951).
1626. *RCA*: Shadowing unit for electron microscopes. Instruments 24, 1057 (1951).
1627. *Grün, L., und Tischer, W.*: Gerät zur Herstellung von Abklatschpräparaten im Auf- und Durchlicht für elektronenoptische Untersuchungen. Optik 9, 241—242 (1952).

G 7. Behandlung und Auswertung der Aufnahmen

1628. *Frith, F., und Mott, R. A.*: A rapid method for the determination of the specific surface and mean particle size of black powders. J. Soc. Chem. Ind. 65, 81 (1946).
1629. *Walton, W. H.*: Application of electron microscopy to particle size measurement. Trans. Inst. Chem. Eng. 51—57 (1947).
1630. *Watson, J. H. L.*: Particle size determination with electron microscope. Analyt. Chem. 20, 576 (1948).
1631. *Sharpe, J. W.*: A graticule for particle size analysis with the electron microscope. J. sci. Instruments 26, 308 (1949).
1632. *Bernard, R., Pernoux, E., und Teichner, S.*: Détermination des surfaces spécifiques au moyen du microscope électronique. C. R. Acad. Sci. Paris 232, 1927—1929 (1951).
1633. *Bernard, R., Pernoux, E., und Teichner, S.*: Anwendung des Elektronenmikroskopes auf die Messung spezifischer Oberflächen. Bestimmung der Wirkksamkeit eines Mahlgutes. J. Chim. Phys. 49, 147—156 (1952).
1634. *Bernard, R., Pernoux, E., und Teichner, S.*: Bestimmung der spezifischen Oberfläche pulverförmiger Stoffe mit dem Elektronenmikroskop. Z. wiss. Mikrosk. mikroskop. Techn. 60, 419—421 (1952).

Die Naturwissenschaft in Lebensbildern großer Forscher

Von Prof. Dr. H. Falkenhagen

224 Seiten, Ganzleinen DM 10.—

Naturwissenschaftliche Rundschau: Das großangelegte, straffgegliederte und von der Warte der modernen Physik aus bearbeitete Werk will jedem Bildungsfreudigen das Wachstum der Naturerkenntnisse und ihrer Anwendungen — von 600 v. Chr. bis zur Gegenwart — an den Lebens- und Lebensbildern von 108 Forscherpersönlichkeiten gleichsam verlebendigen. Der gelehrte Verfasser hat es verstanden, sowohl das gewaltige Erkenntnisgut in lapidarer Kürze zu meistern, als auch in beschwingter Sprache und liebevollem Eingehen die rein menschlichen Seiten der Forscher zu schildern.

P. Walden, Tübingen.

S. HIRZEL VERLAG
STUTTGART

GURR'S

GEGRÜNDET 1915

STANDARDFARBEN UND FÄRBEMITTEL FÜR MIKROSKOPIE

bekannt und gebraucht

in der ganzen Welt

Fordern Sie eine der nachstehenden
Fachschriften an:

- A Catalogue of Stains A 34
- B Gurr's Commentary
- C Laboratory Notes
- D Biological Staining Methods

GEORGE T. GURR LTD.

Laboratorien:

136 NEW KING'S ROAD
LONDON S.W. 6

Drahtwort: MICROSTAIN LONDON

OPTIK

Von Prof. Dr. Hans Falkenhagen

VIII, 188 Seiten mit 43 Abbildungen. 8°. 1949

Halbleinen DM 9.—

Optik, Bd. 7 (1950) Heft 1: In kurzer und konzentrierter, aber doch leicht zugänglicher, keine besonderen Vorkenntnisse erfordernder Darstellung entwickelt der Verfasser die theoretische Optik. Auch die Lorentzsche klassische Elektronentheorie wird dabei mit behandelt; die Optik und die Elektrodynamik bewegter Medien gibt Gelegenheit, auch die Grundlagen der speziellen Relativitätstheorie darzustellen. Die übersichtliche Darstellung, die auf engem Raum vieles bringt, wird dem Buche gewiß Freunde erwerben.

P. Jordan

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

Über eine Methode zum Vergleich desselben Objektes im Licht- und Elektronenmikroskop*)

Von **B. Duhm** und **R. Gönnert**

Mit 7 Abbildungen

Aus den zahlreichen Veröffentlichungen, in denen lichtmikroskopische Aufnahmen zur Deutung elektronenmikroskopischer Bilder herangezogen wurden, spricht das Bedürfnis, für die Elektronenmikroskopie den unmittelbaren Anschluß an die Lichtmikroskopie herzustellen. Bei vielen Objekten, besonders in der Metallurgie und Faserforschung, bei denen es auf die Untersuchung von Oberflächenstrukturen ankommt und man sich der Abdruckverfahren bedient, bereitet die vergleichende Untersuchung desselben Abdruckes oder der betreffenden Objektteile im Lichtmikroskop keine wesentlichen Schwierigkeiten. Für das Studium histologischer Schnitte dagegen hat man sich bisher damit begnügt, einen Nachbarchnitt für den lichtmikroskopischen Vergleich zu verwenden. Dies Verfahren erwies sich jedoch für viele Zwecke als unzulänglich. Deshalb versuchten wir, die bisher übliche Arbeitsweise auf folgende Art zu erweitern.

- A. Vergrößerung des normalerweise im Elektronenmikroskop beobachtbaren Präparatausschnittes;
- B. Vergleich derselben Stelle eines Gewebeschnitts im Licht- und Elektronenmikroskop;
- C. Färbung des Präparates für die lichtmikroskopische und darauffolgende Entfärbung für die elektronenmikroskopische Untersuchung.

Die Beschreibung der experimentellen Ausführung bildet den ersten Teil dieser Arbeit. Im zweiten Abschnitt werden die Vorteile der Anwendung dieser Methode an einzelnen Beispielen erläutert.

I. A. Für die Untersuchung eines möglichst großen Bereiches eines Gewebeschnitts eigneten sich Mehrlochblenden oder Kupfernetze als Präparatsträger nicht, da durch die dazwischenliegenden Stege der Überblick gestört wird. Wir benutzten deshalb Platinblenden, die bis zu einem Lochdurchmesser von 0,4 mm aufgebohrt waren. Die Schwierigkeit ist, ein Folienmaterial zu finden, das über eine derartig große Öffnung ausgespannt werden konnte, ohne unter dem Gewicht des Präparats oder der Einwirkung der Bestrahlung zu reißen. Kollodiumhäutchen bewährten sich nicht, besonders wegen der noch zu besprechenden Weiterbehandlung des

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 6. 6. 1952.

Schnitts. Mit Formwarfolien erzielten wir gute Ergebnisse, nachdem es uns gelang, die Häutchen sehr dünn und gleichmäßig herzustellen. Hierdurch verringerten sich die Unterschiede in der Elektronenabsorption und damit die Entstehungsmöglichkeit von Rissen durch lokale Temperaturspitzen. Die Gleichmäßigkeit der Folien läßt sich durch Anfärben beurteilen. Bei der Untersuchung sehr dünner ($<0,2\mu$) Gewebeschnitte¹⁾ konnten wir häufig ohne jede Störung während mehrtätiger Beobachtungszeit eine sehr große Anzahl (50 bis 100) elektronenmikroskopischer Aufnahmen von demselben Präparat machen. Voraussetzung zur Herstellung solcher in Schärfe und Belichtung gleichmäßiger Bilderserien ist ferner die Einhaltung folgender Bedingungen: 1. Tadellose Sauberkeit des Elektronenmikroskops zur Vermeidung jeder Präparatverschmutzung, Aufladungsstörung und astigmatischen Veränderung. 2. Ausreichende Spulenstromkonstanz zur Erzielung einer gleichmäßigen Bildschärfe. 3. Anwendung kleinster Strahlstromintensitäten ($4-5\mu A$), um Präparat und Folie möglichst wenig zu beanspruchen.

Die Verwendung von Großlochblenden erleichtert die Orientierung in kompliziert gebauten Geweben und das Auffinden spärlich vorhandener, submikroskopischer Teilchen.

B. Um dasselbe Objekt im Licht- und Elektronenmikroskop untersuchen zu können, ergab sich die Notwendigkeit, die Schnitte zunächst auf einen Objektträger (bzw. ein Deckglas) zu bringen. Ein unmittelbares Auffangen der Objekte auf Kupfernetze oder Platinblenden hat den Nachteil, daß wegen der Durchbiegung der Folie keine guten lichtmikroskopischen Aufnahmen bei starker Vergrößerung zu erhalten sind. Bei unseren Großlochblenden hing die Folie etwa 2μ durch²⁾. Bei Anwendung starker lichtmikroskopischer Vergrößerungen macht dies eine gleichzeitige Scharfstellung des ganzen Gesichtsfeldes unmöglich.

Das Aufbringen der Präparate auf Objektträger hat außerdem den Vorteil, daß schon lichtmikroskopisch die uninteressanten Stellen ausgeschaltet werden können. Es mußte deshalb für die Vergleichsuntersuchung im Elektronenmikroskop eine Methode zur Übertragung der interessierenden Präparatstellen vom Objektträger auf die Platinblenden ausgearbeitet werden.

Die Übertragung und sonstige Behandlung der Schnitte geschah folgendermaßen. Eine Schnittserie wurde auf einem mit Formwarfolie überzogenen Glaträger aufgefangen, getrocknet und mit Xylol bei einer Temperatur von $40^{\circ}C$ von der anhaftenden Wachsmischung befreit. Die Verwendung von Formwar war u. a. dadurch bedingt, daß diese Foliensubstanz vom Lösungsmittel nicht angegriffen wurde. Nach lichtmikroskopischer Durchmusterung und Entfernung des Immersionsöls schnitten wir unter dem Mikroskop um die ausgesuchte Stelle ein Viereck von $2-3\text{ mm}$ Kantenlänge in die Folie. Das Einschnneiden eines Kreises mit einem Markierungsapparat bewährte sich nicht so gut, da beim Ablösen des herausgeschnittenen Folienteils die Gefahr des Einreißen bei einer Kreisform größer zu sein schien.

¹⁾ Die Schnitte wurden mit dem bei der Fa. Trüb, Täuber hergestellten Mikrotom von DANON und KELLENBERGER ausgeführt.

²⁾ Ob es gelingt, die störende Durchbiegung bei Verwendung von Kohle- oder Siliziumhäutchen zu vermeiden, wird untersucht.

Gesunde Lunge

(Maus)



Lochdurchmesser: 0.4 mm

Abb. 1. Schnitt durch die hilusnahe Randpartie einer Mäuselunge
a Übersichtsbild aus 35 Einzelaufnahmen elektronenoptisch; 1230: 1, Abbildung: 465: 1 100 kV
b und c Ausschnitte aus a (Phasenkontrast)
Lichtfortsch. 800: 1 Abb. 1230: 1

Der im Wasser abgelöste Folienteil wurde unter einem Stereomikroskop auf der Platinblende aufgefangen.

C. Trotz der Herstellung von Vergleichsaufnahmen hatten wir bei gewissen Fragen Schwierigkeiten in der Deutung. Wir benutzten deshalb die in der Lichtmikroskopie

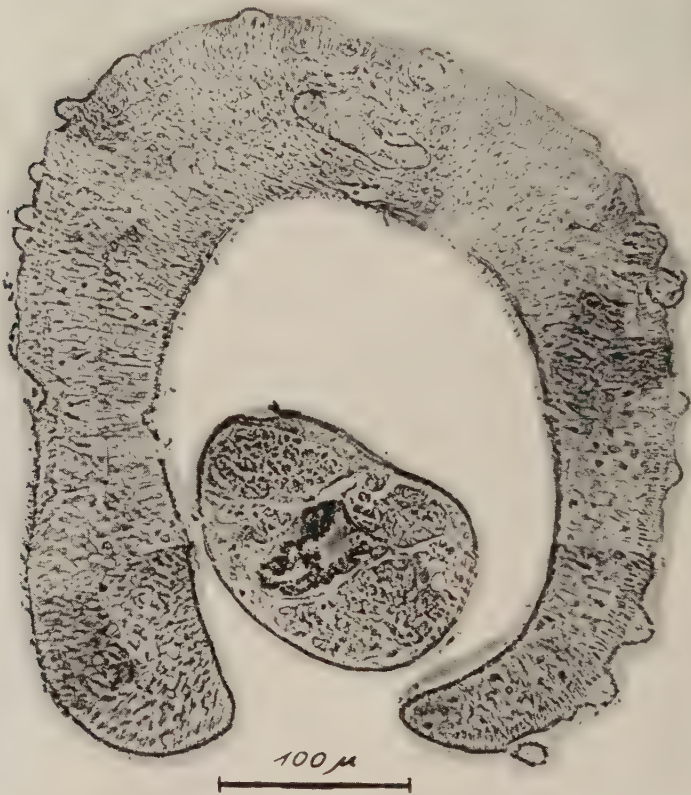


Abb. 2: *Schistosoma mansoni*: (Querschnitt durch Wurmpärchen)
 43 lichtmikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast)
 Lichtoptisch: 800 : 1, Abbildung: 250 : 1, Objektiv: HJ, Pv 90 ×

üblichen Färbmethoden, um die elektronenmikroskopische Identifizierung morphologisch ähnlicher Objekte durch ihr färberisches Verhalten im Lichtmikroskop zu ermöglichen. Die gefärbten Schnitte wurden nach Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen entfärbt, wobei lichtmikroskopisch kontrolliert werden mußte, daß weder Schnitt noch Folie angegriffen wurden. Die Übertragung der Präparate auf die Platinblende geschah in der oben beschriebenen Weise.

II. Die Anwendungsmöglichkeiten der im ersten Teil beschriebenen Methode sollen im folgenden an Hand einiger Beispiele, die verschiedenen Arbeitsgebieten entnommen sind, erläutert werden.

Abb. 1a zeigt den Vorteil, den die Großlochblende bei der Orientierung in einem kompliziert gebauten Gewebe bietet. Es handelt sich um den Teil eines Schnittes durch die hilusnahe Randpartie einer Mäuselunge. Der teilweise ausgezogene Kreisbogen gibt die Randbegrenzung des Blendenlochs an. Die Abbildung ist aus 35 Einzelaufnahmen zusammengesetzt, die elektronenmikroskopisch mit 1230-facher Vergrößerung aufgenommen und lichtoptisch auf das 2500fache nachvergrößert wurden. Das Originalbild bedeckt fast die Fläche von 1 m^2 . Es mußte zur Reproduktion stark verkleinert werden, so daß feinere Strukturen nicht erkennbar sind.

In der rechten Hälfte des Bildes sind das Lungengewebe mit den Alveolen, den Alveolarwänden, den Zellkernen (vor allem der Alveolarepithelien), ferner Schnitte durch Erythrocyten in den Alveolarkapillaren zu sehen. Im linken oberen Teil befindet sich ein großes Blutgefäß mit zahlreichen Schnitten von roten Blutkörperchen, in denen das Hämoglobin wohl als Folge der Susafixierung³⁾ der Membran anliegt. Nach der Mitte des Bildes zu folgt auf die Gefäßwand eine Lage vorwiegend querschnittener Muskulatur. Im linken unteren Bildteil ist Fettgewebe mit dünnen Protoplasmalagen zwischen den hier herausgelösten großen Fetttropfen usw. geschnitten.

Die auf dem Fettgewebe und der Muskulatur eingezeichneten, etwas verzerrten Rechtecke geben den Bereich zweier lichtmikroskopischer Vergleichsaufnahmen wieder, die in Abb. 1b und 1c in fast gleicher Vergrößerung dargestellt sind. Solche Verzerrungen können teils durch die Übertragung von Schnitt und Folie auf den elektronenmikroskopischen Objektträger, teils durch die Elektronenbestrahlung verursacht werden.

Abb. 2 und 3 mögen als weitere Beispiele dafür dienen, wie eine Orientierung im Schnitt und die Deutung der Strukturen beim Überblick über einen großen Bezirk erleichtert werden. Es handelt sich um einen Querschnitt durch ein Pärchen des zu den Trematoden gehörigen menschlichen Blutparasiten *Schistosoma mansoni*. Der Schnitt wurde zuerst lichtoptisch aufgenommen (Abb. 2), dann auf die Großlochblende übertragen und im Elektronenmikroskop untersucht (Abb. 3). Das lichtmikroskopische Bild ist aus 43, das elektronenmikroskopische aus 38 Einzelaufnahmen zusammengesetzt. Zur Wiedergabe mußten beide Bilder verkleinert werden. Im Original bedeckt Abb. 2 bei 800facher Vergrößerung eine Fläche von etwa $0,5 \text{ m}^2$, Abb. 3 bei einer Vergrößerung auf das 2500fache eine Fläche von ungefähr 1 m^2 .

Zum Verständnis der beiden Abbildungen sei hinzugefügt, daß das schlankere Weibchen in einem von dem Wurm-Männchen gebildeten Kanal (*Canalis gynae-cophorus*) liegt. Bei der Fixierung mit Bouin haben sich die übereinandergreifenden

³⁾ Trotz der schlechten Strukturhaltung wählten wir für die vergleichenden Studien zunächst die Susafixierung, da danach viele für die Lichtmikroskopie in Frage kommende Spezialfärbungen angewandt werden können.



Abb. 3. *Schistosoma mansoni*: (Querschnitt durch Wurmpärchen)

Elektronenoptisch: 1230:1, Abbildung: 410:1 100 kV, Präparatblende: Lochdurchmesser 0,4 mm, 38 Einzelaufnahmen

W = Warzen

R = Ringmuskulatur

D = Darm

Pa = Parenchym

L = Längsmuskulatur

DG = Dottergang

DF = Dotterstockfollikel

Seitenränder des Männchens gelöst. Der Rücken des Männchens ist mit kleinen Warzen versehen. Weitere Einzelheiten sind als Erklärung in der Bildunterschrift angeführt.

Es wurde schon hervorgehoben, daß die Färbung des Schnittes oder eines sonstigen geeigneten Objektes für die lichtmikroskopische Untersuchung die Deutung der elektronenoptischen Aufnahmen wesentlich erleichtern kann. Dies soll an den Abbildungen 4—7 erläutert werden.

In Abb. 4 sind in etwa gleicher Größe die lichtmikroskopische Aufnahme eines mit Azan gefärbten Schnittes und das elektronenmikroskopische Bild desselben wieder entfärbten Schnittes einander gegenübergestellt. Die unterschiedlichen Vergrößerungsangaben in der Bildunterschrift sind auf Schrumpfungen und Verzerungen des Präparates zurückzuführen, die aus den bereits bei Bild 1 erwähnten Gründen entstehen können. Als Objekt wurde ein Schnitt durch ein nach Susa⁴⁾ fixiertes *Schistosoma mansoni*-Weibchen gewählt. In der Mitte des Bildes befindet sich der Dottergang mit reifen, Schalentropfen-enhaltenden Dotterzellen, rechts sieht man einen Dotterfollikel mit Dotterzellen in allen Wachstumsstadien. Über dem Dottergang befindet sich der Darm. Die flachen Epithelzellen umgeben als einschichtige Lage das Darmlumen, in dem neben geronnenem, teilweise verdaulichem Eiweiß auch Pigmentkörperchen (ein Abbauprodukt des Blutfarbstoffes) liegen. Die elektronenoptische Aufnahme des sehr dünnen Schnittes gestattet keine eindeutige Unterscheidung z. B. zwischen Chromatintropfen (C) im Kern und Schalentropfen (S) oder zwischen Pigment (P) und Eiweißausfällungen (E) im Darmlumen. In der lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahme (Abb. 4a) des gefärbten Präparates bereitet diese Unterscheidung durch die den verschiedenen Farbtönen entsprechenden Grauwerte jedoch keine Schwierigkeiten. Der Vergleich beider Aufnahmen hilft demnach wesentlich bei der Deutung des elektronenmikroskopischen Bildes. Zur Erkennung der Einzelheiten der so gedeuteten Objektteile können nun stärkere elektronenmikroskopische Vergrößerungen vorteilhaft angewendet werden.

Die letzten Abbildungen stammen aus der Virusforschung, und zwar beziehen sie sich auf das Studium der Vermehrung des Bronchopneumovirus der Maus, worüber demnächst in einer gesonderten Publikation berichtet werden soll. Das Bronchopneumovirus gehört zu den lichtmikroskopisch darstellbaren Viren. Die Elementarkörperchen (ElK) lassen sich im Ausstrich und Tupfpräparat der infizierten Lunge und im Schnitt sehr gut mit Hilfe der Giemsa-Färbung darstellen. Über die Morphologie der ElK der einzelnen Vertreter dieser von RUSKA als Cysticeten bezeichneten Virusgruppe liegen schon zahlreiche Veröffentlichungen vor. Für uns handelte es sich u. a. um die Klärung von 2 Fragen: Sind die lichtmikroskopisch im Ausstrich als Viren angesprochenen ca. 250—350 m μ großen Körnchen identisch mit den auf Grund der elektronenmikroskopischen Studien als ElK bezeichneten Formen? Lassen sich durch das Studium von Lungenschnitten im Elektronenmikroskop ebenfalls Anhaltspunkte für einen Entwicklungszyklus dieses

⁴⁾ Siehe Fußnote S. 263.

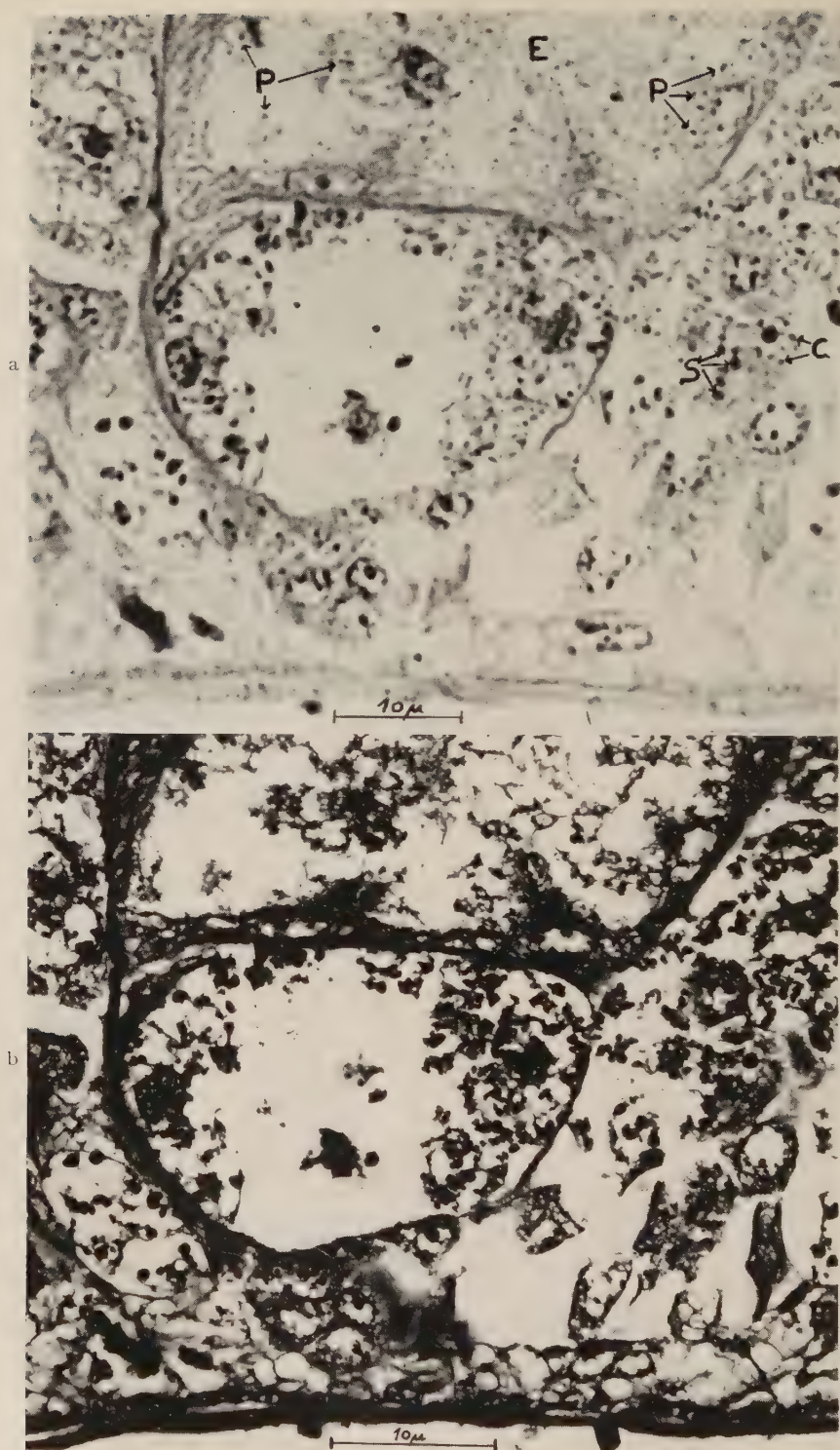


Abb. 4 a und b.

Virus erbringen? (Lichtmikroskopische Studien hatten zur Annahme einer komplizierten Vermehrungsweise dieser Viren geführt).

Durch Färbung (Giemsa) konnten die im Lungentupfpräparat in der Umgebung eines Zellkerns liegenden Körperchen lichtmikroskopisch (Abb. 5a) als ELK bestimmt werden. Nach Entfärbung wurde das Präparat in das Elektronenmikroskop übertragen (Abb. 5b). Obwohl das in der elektronenmikroskopischen Aufnahme sichtbar werdende Zellprotoplasma, Blutserum und seröse Alveolarexsudat die Teilchen weniger gut erkennen läßt, kann durch den Vergleich der geometrischen Anordnung jedes ELK (im Mittel 360 m μ groß) wiedergefunden werden. Der Identitätsnachweis ist damit erbracht.

Wesentlich schwieriger ist das Auffinden der Viruseinschlüsse im Schnitt, da diese und außerdem ihre verschiedenen Alters- und Entwicklungsstadien ungleichmäßig in der Lunge verteilt sind. Um nun das Aufsuchen von Einschlüssen, die vorwiegend ELK enthalten, zu erleichtern, wurden gefärbte Schnittserien lichtmikroskopisch durchmustert. Auf diese Weise konnten verhältnismäßig schnell die in Frage kommenden Einschlüsse gefunden und nach Entfärbung in das Elektronenmikroskop übertragen werden. In den lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen (Abb. 6a und 7a) der gefärbten Präparate sind ELK von unterschiedlicher Größe und Färbbarkeit vorhanden. Das Protoplasma der infizierten Zellen ist nur andeutungsweise sichtbar. Elektronenmikroskopisch (Abb. 6b und 7b) zeigt sich zunächst, daß die Schnitte der Osmium-fixierten Lunge unzureichend gestreckt waren, was besonders für Abb. 6 zutrifft. Wiederum lassen sich alle im Lichtmikroskop gefärbten Gebilde elektronenoptisch identifizieren. Größe (im Mittel 270 m μ) und Gestalt der wie Bläschen aussehenden ELK sind relativ gut bestimmbar. Ihre Durchstrahlbarkeit mit Elektronen ist unterschiedlich.

Die in der beschriebenen Art ausgeführte Vergleichsmethode erwies sich für unsere Studien als äußerst wertvoll, zumal nun die Möglichkeit besteht, mit weiteren Spezialfärbungen für licht- und elektronenmikroskopische Vergleiche desselben Objekts eine eindeutige Unterscheidung zwischen Virus und zelleigenen Bestandteilen vorzunehmen. Über die bei uns laufenden Untersuchungen wird in nächster Zeit berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Es wird eine Methode beschrieben, die den Vergleich desselben Objektes (histologischer Schnitt u. a.) im Licht- und Elektronenmikroskop gestattet und die Deutung der elektronenmikroskopischen Bilder wesentlich erleichtert. Dies wird erreicht durch

Abb. 4. *Schistosoma mansoni* (Querschnitt durch Weibchen)

a Färbung Azan. Lichtmikroskopische Aufnahme: Lichtoptisch: 850 : 1, Abbildung: 1700 : 1,
Objektiv: HJ, 2 mm Apo

b Entfärbt. Elektronenoptisch: 1230 : 1, Abbildung: 2200 : 1, 80 kV

Abb. 5

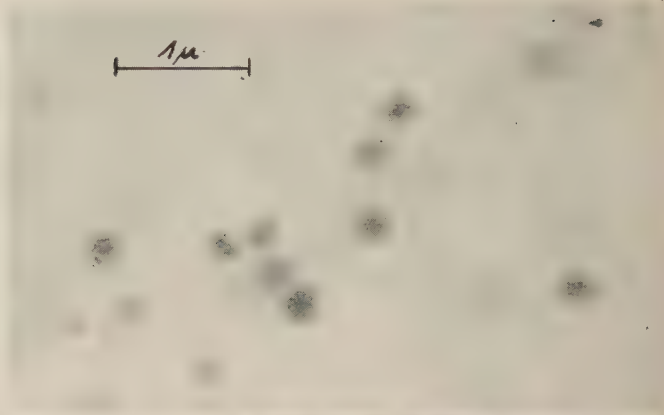
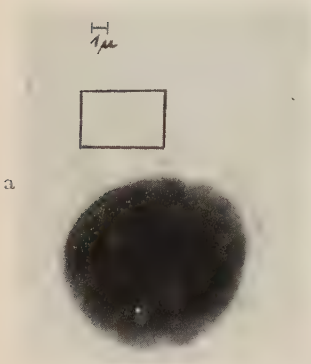


Abb. 6

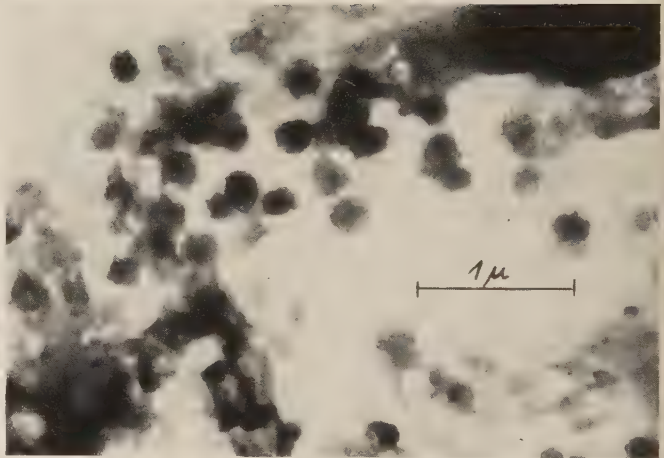
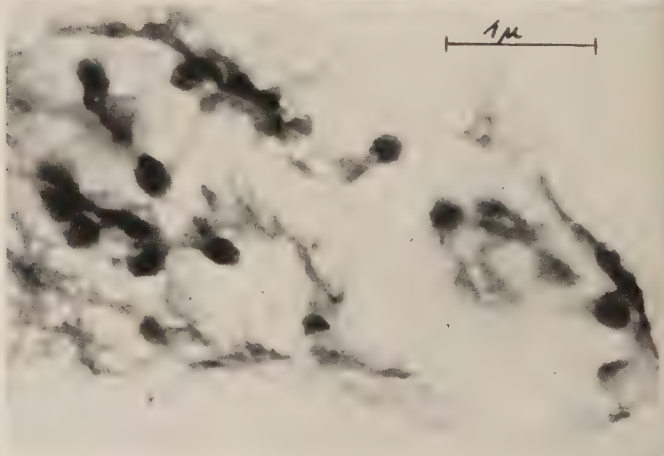
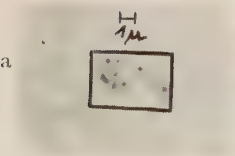


Abb. 7



- A. Erweiterung des im Elektronenmikroskop beobachtbaren Bereiches durch Verwendung einer Großlochblende von 0,4 mm Lochdurchmesser;
 - B. Vergleich derselben Stelle eines Gewebeschnitts im Licht- und Elektronenmikroskop;
 - C. Färbung des Präparates für die lichtmikroskopische Untersuchung und elektronenmikroskopisches Studium des wieder entfärbten Präparates.
2. Die Großlochblende ermöglicht eine störungsfreie Untersuchung umfangreicher Objektbezirke und leichteres Auffinden auch sehr spärlich vorhandener submikroskopischer Teilchen.
 3. Durch die Möglichkeit der Übertragung des Präparates vom Objektträger auf die Großlochblende kann gegebenenfalls schon lichtmikroskopisch der interessierende Bereich ausgewählt und damit eine systematische Untersuchung an Stelle der bisher nur zufälligen Befunde im Elektronenmikroskop vorgenommen werden.
 4. Spezialfärbungen für die lichtmikroskopische Untersuchung helfen bei der Deutung von Gebilden, deren Identifizierung im Elektronenmikroskop alleine zunächst Schwierigkeiten bereitet.

Herrn GASSEN, Fräulein BRESCH und Fräulein GEIST danken wir für ihre wertvolle Hilfe bei den elektronen-, lichtmikroskopischen und tierexperimentellen Arbeiten.

[Eingegangen am 1. September 1952]

Abb. 5. Bronchopneumovirus Lungentupfpräparat
a Giemsa-Färbung. Lichtoptisch: 2000 : 1, Abbildung: 2000 : 1
b Entfärbt. Elektronenoptisch: 6600 : 1, Abbildung: 17 300 : 1 80 kV

Abb. 6. Bronchopneumovirus
Schnitt durch eine infizierte Mäuselunge

a Giemsa-Färbung. Lichtoptisch: 2000 : 1, Abbildung: 2000 : 1
b Entfärbt. Elektronenoptisch: 7500 : 1, Abbildung: 20 200 : 1 80 kV

Abb. 7. Bronchopneumovirus Schnitt durch eine infizierte Mäuselunge

a Giemsa-Färbung. Lichtoptisch: 2000 : 1, Abbildung: 2000 : 1
b Entfärbt. Elektronenoptisch: 7700 : 1, Abbildung: 19 000 : 1 80 kV

Über Präparatveränderungen und Abbildungseffekte bei der Elektronenmikroskopie*)

Von H. Westermann und G. Pfefferkorn

Mit 14 Abbildungen

Ein wichtiges Problem der praktischen Elektronenmikroskopie ist die richtige Deutung der Aufnahmen. Dazu müssen u. a. Präparatveränderungen (Artefaktbildungen) und Abbildungseffekte bekannt sein¹⁾. Als Beitrag hierzu sollen im

Folgenden einige Veränderungen und Abbildungseffekte an Oberflächenlackabzügen und organischen Substanzen beschrieben werden.

Bei einer Lackmatrize bilden die Elektronenstrahlen nur die Dicke in Strahlrichtung, jedoch nicht die Neigung der einzelnen Lackbereiche ab. Dadurch erscheinen steile Erhebungen flacher (Abb. 1a), und das Relief wird verfälscht wiedergegeben (1).

Dieser elektronenoptische Abbildungseffekt läßt sich nur bei Relief-tiefen unter 100 m μ vermeiden, bei denen man den Lack so dick auftragen kann, daß die Oberseite der Matrize wie im Falle der lichtoptischen Abbildung eben ist (Abb. 1b). Zusätzlich kann das Bild von Lack-

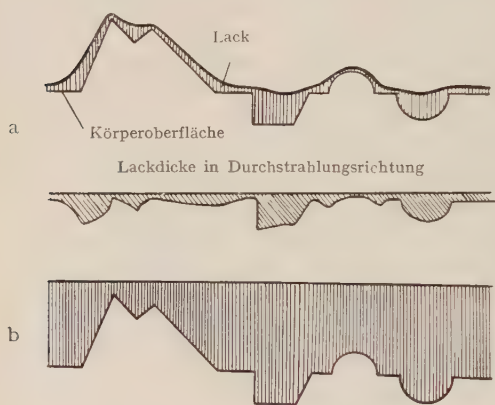


Abb. 1

- a) Lackabdruck einer Oberfläche (unter der Voraussetzung, daß die Matrize nach Ablösen vom Objekt ihre Form beibehält)
- b) Dicker Lackabdruck für lichtmikroskopische Untersuchungen

abdrücken durch deren Verzerrung verändert werden. Bestrahlt man eine Kollodiumhaut (ebene Folie oder Lackmatrize) plötzlich, so zieht sie sich zusam-

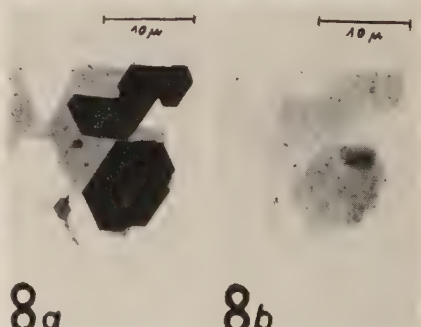
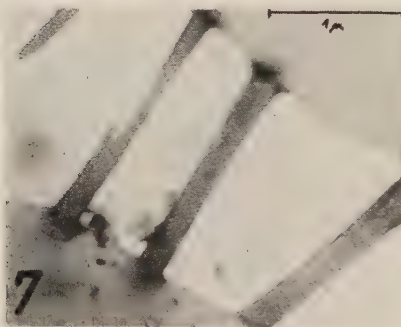
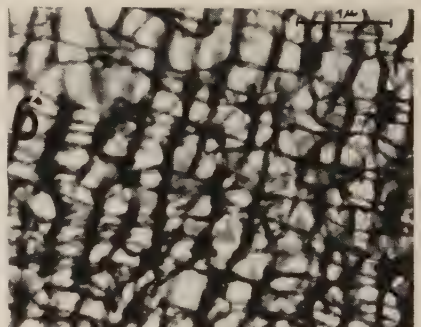
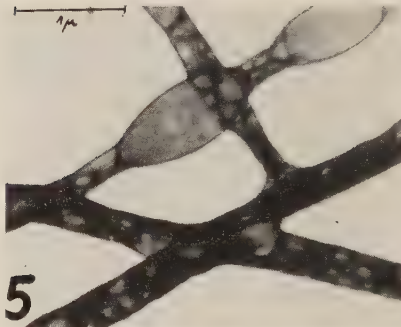
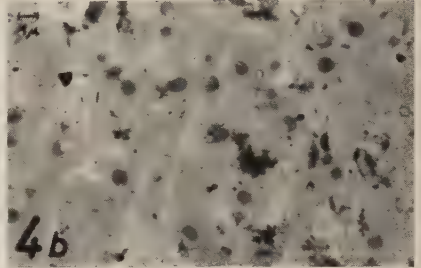
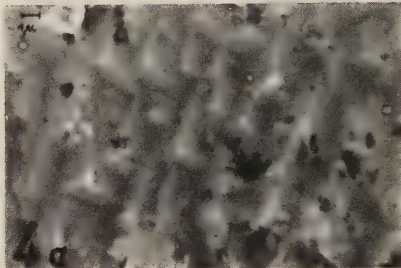
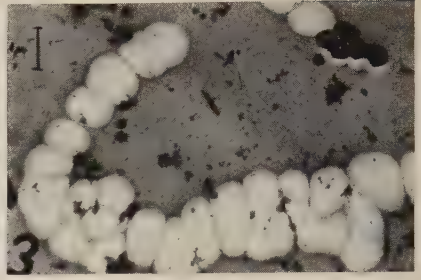
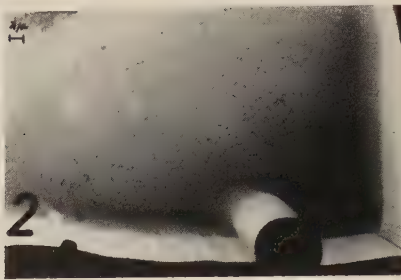
*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen 7. Juni 1952.

¹⁾ Auf eine Aufzählung der diese Fragen behandelnden Literatur soll an dieser Stelle verzichtet werden.

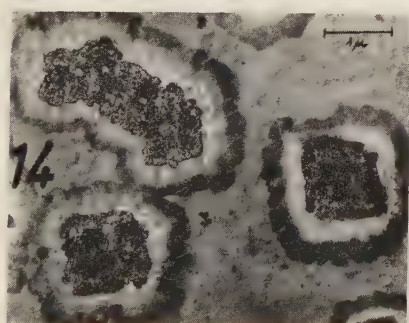
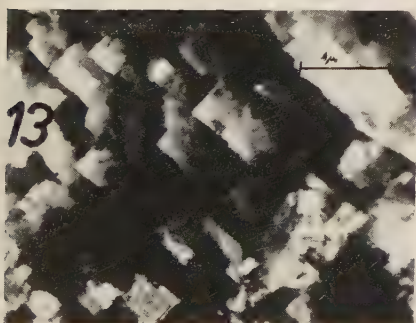
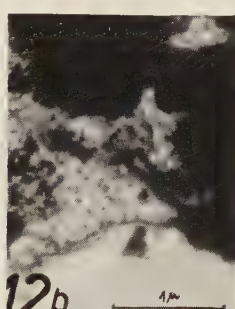
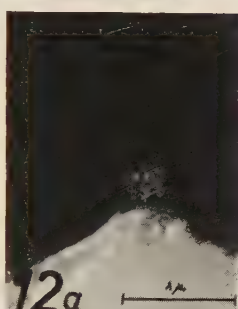
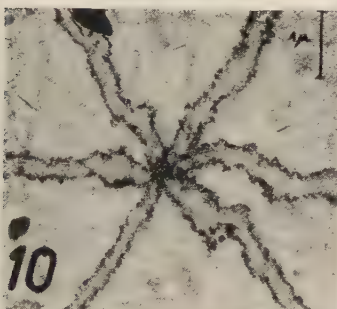
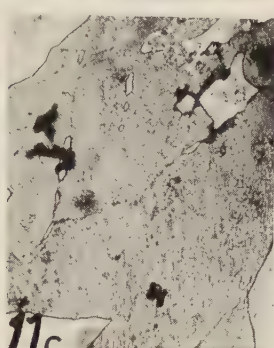
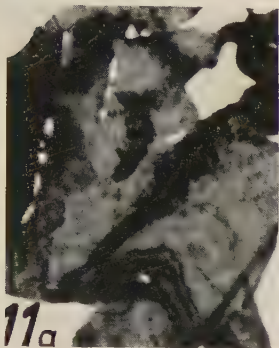
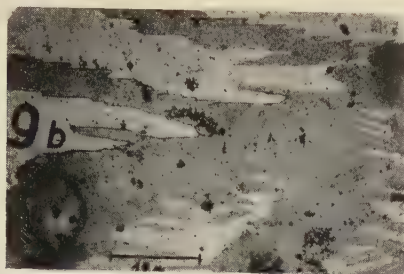
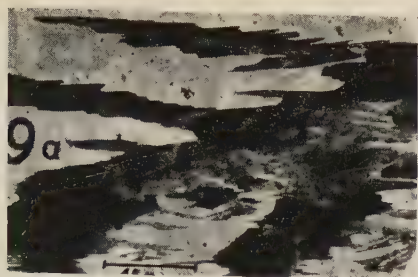
men und dehnt dabei benachbarte, nicht bestrahlte Bereiche. Auf Abb. 2 wurde der unter den Drahtstegen des Trägernetzes vor Strahlung geschützt liegende Teil der Folie gedehnt und hervorgezogen. Dabei entsteht ein dünnerer, durchsichtiger Rand, dessen Verbreiterung man verfolgen kann, indem man in einzelnen Schritten die Intensität des Elektronenstrahles für kurze Zeit steigert. Dickere Stellen einer Matrice ziehen sich stärker zusammen als dünnere, wobei letztere auseinandergezogen werden. Dadurch erscheinen Erhebungen verzerrt und abgeflacht. Dies kann soweit gehen, daß die Folie an den dünnsten Stellen zerreißt (2). So verläuft z. B. bei Abdrücken von kugelförmigen Streptokokken (Abb. 3) die Dehnung bei kettenförmig aneinanderliegenden Mulden bevorzugt senkrecht zu deren Erstreckung, während einzeln liegende fast gleichmäßig gedehnt werden. Diese Verzerrungen lassen sich weitgehendst durch Verwendung geringer Bestrahlungsintensitäten oder durch Stabilisation der Lackmatrice mittels Aufdampfschichten verhindern (3). Neben dieser Formverzerrung tritt bei großen Dickenunterschieden der Lackmatrice schon im ersten Augenblick der Elektronenbestrahlung eine Kontrastverringering ein, die sich nur bei äußerst geringen Intensitäten mit sehr langen Belichtungszeiten vermeiden läßt. Abb. 4b zeigt an einem Oberflächenabdruck von geätztem Quarz deutlich den Verlust des plastischen Eindrucks und das stärkere Hervortreten von Verunreinigungen nach üblicher Elektronenbestrahlung gegenüber langfristiger, schonender Durchstrahlung (Abb. 4a). Dies dürfte die sichtbare Auswirkung der zuerst von König festgestellten (4) und näher untersuchten (5) Umwandlung der Kollodiumhaut durch die Elektronenstrahlen sein, wobei diese an Masse verliert und durchsichtiger wird.

Im Folgenden soll nun über einige Beobachtungen an Eiweißstoffen und Aminosäuren berichtet werden, deren Untersuchung zu Vergleichszwecken mit biologischem Material durchgeführt wurde. Aufgestäubte Kristalle von Aminosäuren zersetzen sich infolge ihrer Größe im Elektronenstrahl im allgemeinen sehr schnell; man kann aber die Kinematik ihrer Zersetzung erfassen, indem man anfangs mit geringsten Intensitäten und langen Belichtungszeiten arbeitet. So wurden an Glykokollnadeln unregelmäßige, blasige Zersetzungserscheinungen beobachtet, wie sie von Zellulosefasern her (6) bekannt sind (Abb. 5). Kristalle von p-Aminobenzoesäure hinterlassen ein wirres Kohlenstoffgerüst (Abb. 6). Aus Lösungen aufgetrocknete Aminosäurepräparate verhalten sich unterschiedlich. Glykokoll und p-Aminobenzoesäure zeigten gelegentlich granuläre Zersetzungsstrukturen (Abb. 7). Im allgemeinen trat bei Bestrahlung eine Aufhellung der Präparate ein (Abb. 8a, b; 9a, b).

Bei der Untersuchung verschiedener Eiweißstoffe trockneten reine Präparate in unregelmäßig strukturierten Schichten auf. Bei Edestin, als Globulin unter NaCl-Zusatz gelöst, zeigten die Präparate dunkle Linien, die sich durch Wandern bei Neigung des Primärstrahles als Interferenzschlieren zu erkennen gaben. Daraufhin wurden anderen Eiweißlösungen verschiedene Elektrolyte zugesetzt, wobei sich vorwiegend Dendriten bildeten, welche gleichfalls Interferenzschlieren aufwiesen. Besonders ausgeprägte Reflexerscheinungen waren an Präparaten von Rinder-



- Abb. 2. Maschenrand eines Objektnetzes mit gedehnter Folie. Elektronenopt. Vergr. 1036:1, Gesamtvergrößerung 1800:1
- Abb. 3. Verzerrter Lackabdruck von Streptokokken. (Die haften gebliebenen Streptokokken im Bilde rechts oben zeigen die ursprüngliche Größe der Abdrücke an.) Elektronenopt. Vergr. 3315:1, Gesamtvergrößerung 5300:1
- Abb. 4. Lackabdruck von angeätztem Quarz, aufgenommen: a) mit geringer, b) mit normaler Intensität. Elektronenopt. Vergr. 1036:1, Gesamtvergrößerung 2400:1
- Abb. 5. Blasig zersetzte Glykollnadeln. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 15000:1
- Abb. 6. Ausschnitt aus zersetztem Kristall von p-Aminobenzoesäure. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 12000:1
- Abb. 7. Granuläre Zersetzungsstruktur von aufgetrocknetem Glykoll. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 18000:1
- Abb. 8. Aufgetrocknete Cystinkristalle: a) mit geringer, b) mit normaler Intensität bestrahlt. Elektronenopt. Vergr. 1036:1, Gesamtvergrößerung 1200:1



bb. 9^a). Alanin, aufgetrocknet: a) mit geringer, b) mit normaler Intensität bestrahlt. Elektronenopt. Vergr. 1036:1, Gesamtvergrößerung 1200:1

bb. 10. Interferenzschlieren auf Rinderseumalbumin (mit Pt-Rh bedampft). Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 9000:1

bb. 11^a). Edestin a) Interferenzschlieren, b) beginnende Zersetzung, c) völlig zersetzt. Elektronenopt. Vergr. 3315:1, Gesamtvergrößerung 2700:1

bb. 12^a). Edestin (mit Pt-Rh bedampft) a) nach 10minütiger, b) nach 2stündiger Bestrahlung. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 15000:1

bb. 13. Zersetzungsstrukturen eines Kristalles aus Gelatine mit NaCl-Zusatz. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 12000:1

bb. 14. Hofbildungen bei Agar mit NaNO₃-Zusatz. Elektronenopt. Vergr. 10150:1, Gesamtvergrößerung 9000:1

¹⁾ Infolge ungleichmäßiger Foliendehnung bei stärkerer Bestrahlung lassen sich zusammengehörige Bildteile nicht vollständig zur Deckung bringen.

serumalbumin mit NaCl-Zusatz zu beobachten (Abb. 10). Weil Eiweißstoffe schon kristallin erhalten werden können, wurde der gleiche Versuch mit amorphen Stoffen, wie Gelatine und Agar, wiederholt. Auch hierbei traten entsprechende Auftrocknungsunterschiede sowie Reflexbänder auf. Die Interferenzschlieren beruhen auf der gerichteten Einlagerung von kleinsten durchstrahlbaren Salzkriställchen, wie durch Elektronenbeugung und Dunkelfeldmikroskopie mit definierten Bragg-Reflexen (7) nachgewiesen werden konnte (8). Die elektronenmikroskopische Untersuchung derartiger Präparate ergibt daher, genau wie bei Einkristallen (9), keine Abbildung im üblichen Sinne in Bezug auf Zusammenhang zwischen Bildhelligkeit und Massenverteilung, was bei der Beurteilung zu berücksichtigen ist.

Während an Präparaten von Eiweißstoffen, Gelatine und Agar ohne Elektrolytzusatz schnelle Veränderungen nicht beobachtet wurden, zeigten elektrolythaltige Präparate deutliche Zersetzungerscheinungen. Diese beginnen an einigen Stellen unter Aufhellung, wobei feine Risse sichtbar werden (Abb. 11a, b, c). Gleichzeitig wandern die Schlieren, was auf Verbiegung des Präparates als Folge der Zersetzung hindeutet. Bei Edestinpräparaten konnte beobachtet werden, wie sich kleine Bereiche aufhellten und wieder verdunkelten. Dunkle Kügelchen von 20 bis 50 m μ Durchmesser bewegten sich hin und her, vereinigten sich zu größeren und zerfielen wieder (Abb. 12a, b), was auf Schmelzvorgänge schließen läßt. Bei der Zersetzung von Gelatine und Agar mit Elektrolytgehalt traten würfelförmige Bereiche auf. Besonders bei Gelatine-NaCl-Präparaten zersetzten sich große vier-eckige Kristalle schon bei normaler Bestrahlung von der Mitte aus. Aus den würfelförmigen Abbaubereichen (Abb. 13) kann man schließen, daß der Kristall aus Blöcken verschiedener Stabilität zusammengesetzt ist. Reine NaCl-Kristalle dieser Größe zersetzen sich nach unseren Beobachtungen bei diesen Intensitäten niemals so schnell. Ähnliche Blockstrukturen an teilweise zersetzten Steinsalzkristallen beobachteten BURTON und Mitarbeiter (10).

Während der Zersetzung elektrolythaltiger Stoffe verdunkelten sich aufgehellte Präparatstellen gelegentlich wieder, wobei man das Wandern der dunklen Zonen über kleinere Bereiche verfolgen konnte. Da diese Erscheinung besonders von dickeren Stellen ausgeht, kann man annehmen, daß die dort höhere Temperatur dafür verantwortlich ist. So hat sich z. B. in Abb. 14 Natriumnitrat unter Hofbildung in die Umgebung verlagert. BURTON und Mitarbeiter geben an, daß bei ähnlichen Erscheinungen die reine Temperaturerhöhung zur Sublimation nicht ausreicht und nehmen deshalb eine Ionenwanderung auf der Trägerfolie an. Wir halten trotzdem eine Sublimation für denkbar, da die auftreffenden Elektronen sicherlich auf einige Partikel eine dazu ausreichende Energie übertragen können.

All diese Erscheinungen zeigen, daß man zur Deutung elektronenmikroskopischer Befunde an organischen Präparaten nicht allein die Aufnahme eines Momentzustandes zugrunde legen darf, sondern eine unmittelbare Beobachtung am Leuchtschirm eventuell in Verbindung mit der Elektronenbeugung erforderlich ist.

Schrifttum

- 1) PFEFFERKORN, G., N. Jb. Mineral. Abh. **84**, 281 (1952).
- 2) SCHRADER, A., Z. Wiss. Mikroskop. **60**, 309 (1952).
- 3) MAHL, H., Diskussionsbemerkung auf der Tagung für Elektronenmikroskopie in Tübingen 1952.
- 4) KÖNIG, H., Nachr. Göttinger Akad. Wiss. Math.-phys. Kl. **1946**, 24.
- 5) KÖNIG, H., Zeitschr. f. Phys. **129**, 483 (1951).
- 6) MAHL, H., Kolloid-Zeitschr. **96**, 7 (1941).
- 7) RANG, O., u. H. SCHLUGE, Optik **9**, 463 (1952).
- 8) WESTERMANN, H., u. G. PFEFFERKORN, Optik (1953) im Druck.
- 9) KÖNIG, H., Naturwiss. **37**, 486 (1950).
- 10) BURTON, E. F., SENNETT, R. S., u. S. G. ELLIS, Nature **160**, 565 (1947).

[Eingegangen am 25. November 1952]

Die Anwendung des Tontrennverfahrens für die Papierkopien elektronenmikroskopischer Aufnahmen*)

Von **A. Hell**

Mit 2 Abbildungen

Da Kopierpapiere einen wesentlich geringeren Schwärzungsbereich umfassen als Photoplaten, ist es oft schwierig oder gar unmöglich, in einer Vergrößerung alle bildwichtigen Teile mit dem nötigen Detailreichtum wiederzugeben. Bei bildmäßigen, künstlerischen Photographien kann man sich in solchen Fällen mit der sogenannten Tontrennung helfen¹⁾. Man versteht darunter, ganz allgemein, Verfahren, die durch Übereinanderkopieren von Tonauszügen aus dem Original-Negativ tonverbesserte Vergrößerungen ergeben. Die Tontrennung will die bildwichtigen Lichter und Schatten, gut abgestuft, auf der kurzen Tonskala des Positivpapiers unterbringen, zugleich die Mitteltöne zusammendrängen, um damit die unbedeutenden, das Bild nur unruhig machenden Einzelheiten zu unterdrücken.

Es wurde nun nach einem Vorschlag von Prof. ROLLWAGEN untersucht, ob dieses Verfahren oder eine Variante für wissenschaftliche Zwecke — insbesondere für die Mikroskopie und für die Elektronenmikroskopie — herangezogen werden kann. Der Wissenschaftler muß ein Bild natürlich anders bewerten als der Künstler. Bei der bildmäßigen Aufnahme zählt für die Beurteilung des Erfolges einer Tontrennung nur der Bildeindruck. Von der Kopie einer wissenschaftlichen, insbesondere elektronenmikroskopischen, Aufnahme ist folgendes zu fordern:

1. Möglichst viele Einzelheiten des Negativs sollen auf das Papier übertragen werden.
2. Über- und unterbelichtete Bildteile sollen durch Aufrichtung der Gradation in diesen Teilen mit normalen Kontrasten in der Vergrößerung herauskommen. Es drängen sich die zusätzlichen Fragen auf:
 - a) Kann jede Art von Doppelkontur und Verzerrung mit Sicherheit vermieden werden?
 - b) Wie kann die Umbildung einzelner Tonwerte meßtechnisch erfaßt werden?

PERSON empfiehlt bei Bildaufnahmen, bei denen es erforderlich erscheint, eine Tontrennung bei der Anfertigung des Positivs vorzunehmen, bereits die Herstellung des Originalnegativs diesem Vorhaben anzupassen. Das Negativ soll nicht zu

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 8. 6. 1952.

¹⁾ Lit. A. PERSON: Bildmäßige Leica-Photos durch Tontrennung, Frankfurt 1935. — Otto HAEHLER: Meisterliche Vergrößerung durch Tontrennung, Verlag Knapp, Halle 1935.

knapp belichtet und kräftig entwickelt werden und kann dann unmittelbar zur Wiedergabe der Schatten Verwendung finden. — Es braucht dann nur mehr ein Tonauszug für die Lichter hergestellt werden. — Diese Vereinfachung fällt in unserem Falle weg. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen läßt sich meistens die Anfertigung auch eines Schattenauszeuges nicht umgehen. Aus diesem Grund und wegen der hohen Forderung hinsichtlich der Deckung der Linien wurde versucht, an Stelle der PERSONSchen Methode die Tontrennung mittels kombinierter Negative vorzunehmen. Dabei zeigte es sich vorteilhaft auf folgende Weise zu verfahren.

I. Man kopiert das Originalnegativ so Schicht an Schicht auf eine normal bis hart arbeitende Diapositivplatte, daß bei kräftiger Entwicklung auch die höchsten Lichter gut durchgezeichnet sind, ohne Rücksicht darauf, daß dabei die Schatten und tieferen Mitteltöne vollkommen gedeckt und ohne jede Struktur erscheinen. Von diesem Diapositiv gewinnt man durch Kontaktkopie das „Lichternegativ“. Dieses Negativ darf auf keinen Fall zu dicht ausfallen, muß aber verhältnismäßig hart abgestuft die Lichter und oberen Mitteltöne bringen. Die Schattenpartien bleiben glasklar. — Darum der Name Tonauszug der Lichter oder Lichternegativ.

Der Auszug der Schatten oder das sogenannte Schattennegativ soll entsprechend nur die Abstufungen der Schatten und unteren Mitteltöne enthalten. Man stellt dazu zunächst ein sehr kurz belichtetes Diapositiv aus hartem Dia-Material her. Dieses Diapositiv zeigt bei kräftiger Entwicklung nur gut gedeckte Schatten und die unteren Mitteltöne, sonst ist es klar und durchsichtig. Mit parallelem Licht wird nun dieses Diapositiv von der Rückseite auf eine harte Diapositivplatte kopiert. Wird diese lange belichtete Platte ganz flach entwickelt (etwa Rod. 1 : 50 bis 1 : 100) — so erhält man schließlich das schwach gedeckte, in den Schatten gut abgestufte Schattennegativ.

Die so gewonnenen zwei Negative werden Schicht auf Schicht zusammengelegt, mittels der im Originalnegativ angebrachten und mitkopierten Paßmarken in Deckung gebracht und an den Rändern verklebt. Das damit erhaltene insgesamt flach gradierte Doppelnegativ kann unmittelbar zur Herstellung der Vergrößerung auf hartem bis sehr hartem Papier benutzt werden. Ganz wesentlich ist es, daß das Schattennegativ nicht zu dicht ausfällt, denn dies würde wiederum ein entsprechend dichtes und sehr kontrastreiches Lichternegativ erfordern. Das kombinierte Negativ wäre also auch stark gedeckt und kontrastreich. Diesen Umstand aber sollte die Tontrennung gerade beseitigen.

II. Hat ein Originalnegativ über- bzw. unterbelichtete Bildteile, so läßt sich die gewünschte Aufrichtung der Gradation meist nur durch mehrmaliges Umkopieren, eventuell unter Zuhilfenahme von Verstärkung und Abschwächung, erreichen. So wurde der Schattenauszug zu Bild 1 auf folgende Art gewonnen:

Vom harten Diapositiv der Originalaufnahme wird ein lang belichtetes und kräftig entwickeltes Negativ hergestellt, von diesem ein kräftiges, verstärktes Diapositiv und davon erst das flach zu entwickelnde Schattennegativ. Belichtungszeit, Entwicklung, Verstärkung und Plattenmaterial waren natürlich darauf abgestellt, bei jedem Schritt die Kontraste in den Schatten zu vergrößern. — Das

Schattennegativ wurde schließlich noch mit Blutlaugensalz-Abschwächer geklärt. Dieses Negativ wurde mit einem Lichternegativ kombiniert, das nach der in I) beschriebenen, einfacheren Art angefertigt wurde.

Bei beiden Arten der Tontrennung I) und II) werden die mittleren Bereiche der Tonskala zusammengeschoben, man muß also einen Verlust an Einzelheiten befürchten. Hierzu läßt sich vorerst nur sagen, daß dies gerade der Tonbereich ist, in dem die Gradation des Photomaterials am steilsten ist und also eine solche Veränderung am ehesten tragbar erscheint. Wir werden das an Hand quantitativer Messungen genauer untersuchen. Den Wert des bisher Erreichten zeigen die Bilder 1 und 2.

Die angegebenen Arbeitsmethoden haben neben der guten Tonwiedergabe Vorteile für die einwandfreie Deckung der Teilbilder. Man hat nicht, wie beim Personverfahren, bei jeder Vergrößerung und den damit verbundenen Belichtungsproben die Mühe mit dem Übereinanderpassen der Tonauszüge, sondern man sorgt bereits am kombinierten Endnegativ für eine einwandfreie Deckung. Diese Aufgabe ist dank folgenden Umstandes nicht allzu schwierig. Sowohl das Schatten- wie auch das Lichternegativ ist schwach gedeckt und die mit den Paßmarken erreichte Genauigkeit der Deckung läßt sich leicht mit einer Lupe in der Durchsicht überprüfen. Da außerdem das Schattennegativ, zwangsläufig, im wesentlichen nur die Abstufungen in den Schatten enthält, während die Lichter als fast strukturlose Grautöne erscheinen, umgekehrt das Lichternegativ hart gezeichnet in den Lichtern und vollkommen klar in den Schatten ist, so ist bei Bildern, wie sie das Beispiel zeigt, für weite Bereiche der Tonskala die Möglichkeit zum Auftreten von Doppelkonturen gar nicht gegeben. — Eine Verzerrung der Linien dürfte bei ausschließlicher Verwendung von Plattenmaterial und des Kontaktabzuges kaum auftreten können. —

Die Verschiebung der Tonwerte durch das Tontrennverfahren kann quantitativ erfaßt werden, wenn bei allen Umkopierungen ein Graukeil mitkopiert wird.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen verdient das Verfahren der Tontrennung beim elektronenmikroskopischen Arbeiten Beachtung. Man darf nicht vergessen, daß in der Elektronenmikroskopie das Kopieren ein Bestandteil des „Meßvorganges“ ist.

Es sei hier noch erwähnt, daß die Auswertung in der Projektion — also ohne Kopie — auch kein voll befriedigender Ausweg ist, da das betrachtende Auge auf die hellsten Bildstellen adaptiert und damit auch den Bildinhalt dunkler Partien unterbewertet. Man kann sich leicht davon überzeugen, wenn man z. B. eine Aufnahme von der Art der Abbildung 1 zur Projektion wählt. Die Details in den Bakterien sind nur zu sehen, wenn durch eine geeignete Blende die hellen Partien im übrigen Bild überdeckt werden, während ohne diese Maßnahme das Auge, „geblendet“ von den hellen Partien, die dunklen Flächen ohne Struktur sieht.

[Eingegangen am 12. Dezember 1951]

Abb. 1. Normale Kopie einer Bakterienaufnahme
Abb. 2. Kopie nach dem Tontrennverfahren



Abb. 2

Erfahrungen bei der elektronenoptischen Darstellung von Bakteriophagen mit dem Filmbewuchsverfahren*)

Von **Hansjürgen Raettig**

Mit 12 Abbildungen auf 6 Tafeln

Für die elektronenoptische Darstellung von Bakteriophagen sind alle bisher üblichen Präparationsverfahren für biologische Objekte herangezogen worden. Man kann die Bakteriophagen ohne Bakterien mit der Tropfenmethode auf den Film bringen; hierzu ist es erforderlich, die Phagen durch Ultrazentrifugation oder andere Methoden in der Suspensionsflüssigkeit anzureichern. Von den Oberflächenmethoden sind vor allem das Abklatsch- und das Abziehverfahren üblich geworden; beide sind von H. RUSKA eingehend beschrieben worden. Mit dem Abklatschverfahren haben vor allem KOTTMANN und HENNESSEN in Deutschland gearbeitet, während das Abziehverfahren vor allem in Amerika üblich wurde (WYCKOFF). Schließlich ist das Filmbewuchsverfahren zu nennen, das 1948 von HILLIER, KNAYSI und BAKER beschrieben wurde. Wir haben uns nach einigen Versuchen mit dem Abklatschverfahren ganz dem Filmbewuchsverfahren zugewendet, weil es für die Präparation von Bakteriophagen wesentliche Vorteile bietet.

Bevor diese Vorteile kurz skizziert und an Hand von einigen Bildern praktisch demonstriert werden, möchte ich kurz die Technik dieses Verfahrens schildern.

Auf eine frische, etwa 6—8 mm dick gegossene Wasserblau-Dextrose-Agarplatte werden etwa 20 ccm filtrierte und sterilisierte Aqua dest. pipettiert und 5 Min. stehen gelassen. Dann wird die Flüssigkeit abgegossen und noch einmal Aqua dest. aufgegossen. Gleich danach wird in üblicher Weise in der Mitte der Platte auf das Aqua dest. ein kleiner Tropfen eines Gemisches von Zaponlack und Amylacetat (1 : 1) getropft, der sich sofort über die ganze Wasseroberfläche (Petri-Schale von 10 cm \varnothing) ausbreitet. Diese Ausbreitung des Lackes wird offenbar durch die von der Agaroberfläche in Lösung gehenden Substanzen behindert, wenn man nicht die angegebene Vorwaschung durchführt. Nachdem der Film 3 Min. getrocknet ist, wird vorsichtig mit Hilfe eines vorher in den Rand des Agars geschnittenen kleinen Loches das Aqua dest. so abpipettiert, daß sich der Film langsam und ohne Faltungen auf die Agaroberfläche niederläßt. Mit etwas geöffneter Oberschale wird die Platte so lange in den Brutschrank gestellt, bis die Feuchtigkeit voll abgetrocknet ist. Nun wird auf die Mitte des Films das Gemisch einer 4stünd. Bakterienkultur und des darzustellenden Bakteriophagen (etwa 0,2 ccm) aufgetropft. Da die Flüssigkeit sich nicht ohne weiteres auf dem Film ausbreitet, muß man den Tropfen mit einem Glasspatel so verteilen, daß der Film nicht verletzt wird und die Flüssigkeit nicht über den Rand des Filmes hinaus und dann unter den Film läuft und auch dort ein Wachs-

*) Vortrag auf der 1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 8. 6. 1952.

tum verursacht. Bei Zimmertemperatur wird die Platte so lange halb aufgedeckt stehen gelassen, bis das Bakterien-Bakteriophagen-Gemisch eingetrocknet ist. Dann wird die Platte bei 37° bebrütet. Nun wird ein beliebiges Filmstück mit einem scharfen und trockenen Skalpell so ausgeschnitten, daß es in der Mitte eines viereckigen Agarstückes von etwa 5 mm Kantenlänge liegt; dabei müssen die Schnitte schnell mit einem kleinen Schlag durchgeführt werden, damit nicht, zumal bei dem vierten Begrenzungsschnitt, der Film von der Agaroberfläche heruntergezogen und damit zerstört wird. Mit der Messerspitze wird das Agarstück vorsichtig herausgehoben und in eine mit Aqua dest. gefüllte Schale langsam und etwas schräg eingetaucht. Hierbei soll sich, bei dem zuerst eintauchenden Rand beginnend, der Film vom Agar ablösen und allein auf der Wasseroberfläche schwimmen bleiben, ohne daß die Oberfläche des Filmes benetzt wird. Die Blende, die mit einer Pinzette mit gebogenen Enden gefaßt und in einiger Entfernung von dem schwimmenden Filmstückchen untergetaucht wird, wird langsam unter den Film bewegt; durch vorsichtige Aufwärtsbewegung wird der Film auf die Blende gelegt und aus dem Wasser gehoben. Durch vorsichtiges Abtupfen auf Fließpapier wird die Feuchtigkeit von der Unterseite des Filmes abgesaugt. Nach kurzem Trocknen ist das Präparat ohne weitere Fixierung verwendungsfähig.

Für die quantitative Zusammensetzung des Bakteriophagen-Bakterien-Gemisches und für die Bebrütungszeit dieses Gemisches auf dem Film lassen sich keine festen Normwerte aufstellen. Handelt es sich um einen virulenten Phagen, der mittelgroße bis sehr große Löcher im Bakterienrasen entstehen läßt, so wählt man eine Phagenverdünnung, bei der eine größere Zahl von Löchern entsteht. Nach der Bebrütung von 12 bis 18 Stunden bei 37° erscheinen diese auf der befilmten Wasserblau-Dextrose-Agarplatte ebenso deutlich wie auf der Kontrollplatte. Auch auf dem losgelösten, schwimmenden Film kann man die dunkelblaue Umrandung des Loches deutlich erkennen, so daß jede beliebige Stelle des Phagenloches, Mitte oder Randgebiet, mit der Mitte der Blende aufgefangen werden kann. Wenn wir einen Kleinlochphagen darstellen wollen, so empfiehlt sich zur Präparation ein Phagentiter, bei dem gerade noch eine konfluierende Lyse auf dem Film eintritt. Für den Ausschnitt kann dann eine beliebige Stelle gewählt werden. Für diese Präparationen wird in der Regel eine 4stündige Bakterienkultur benutzt. Wenn der Phage wenig virulent ist und sehr schnell viele resistente Bakterien auskeimen, muß die Bebrütungszeit auf dem Film herabgesetzt werden. Dies gilt auch für den Fall, daß man gern einzelne phagenbefallene Bakterienzellen darstellen will; hier empfiehlt es sich weiter, die Zahl der Testbakterien durch Verdünnung der Bakterienkultur herabzusetzen. Diese Technik muß man auch verwenden, wenn man die Wirkung der „Bakterienlysine“ (RAETTIG) elektronenoptisch darstellen will. Wenn man diese kurzen Bebrütungszeiten von 2 bis 3½ Stunden verwenden muß, so ist es notwendig, anschließend die Präparate zu fixieren, damit das weitere Bakterienwachstum unterbunden wird.

Die Fixation haben wir mit Formalindämpfen vorgenommen. Die aus der befilmten Platte ausgeschnittenen Würfel werden auf Objektträger gelegt und in eine große bei 37° vorgewärmte und mit Vaseline abgedichtete Schale gestellt, in der eine offene mit 40% igem Formalin beschickte Petrischale steht. Hier verbleiben die befilmten Agarwürfel für 15 Minuten im Brutschrank bei 37° C. Dann erst werden die Filme abgeschwemmt und auf die Blenden präpariert.

Da sich jeder Bakterienstamm und jeder Bakteriophage anders verhält, muß man für jede neue Präparation die zu verwendenden Phagen- und Bakterientiter

wie die Bebrütungszeit ausprobieren und festlegen. Bei der Kontrolle der fertigen Präparate kann die lichtoptische Betrachtung mit stark vergrößerndem Trockensystem wertvolle Dienste leisten.

Die Vorteile des Filmbewuchsverfahrens gegenüber den anderen üblichen Präparationsmethoden sind folgende. Die Technik dieses Verfahrens ist bei einiger Übung so einfach, daß kaum Präparationsversager auftreten, eine so hohe Ausbeute an brauchbaren Präparaten ist nur mit diesem Verfahren erreichbar. Der zweite besondere Vorteil liegt darin, daß die Schädigung des Präparates auf ein Minimum beschränkt wird und die topographische Lagerung von Bakterien und Phagen optimal erhalten bleibt. Auch dieser Vorteil ist bei keinem anderen Verfahren so gut gewährleistet wie bei dem Filmbewuchsverfahren. In den beigefügten Tafeln sind 12 Beispiele dargestellt, die mit verschiedenen Modifikationen des hier beschriebenen Präparationsverfahrens gewonnen wurden und die die Darstellungsmöglichkeit der verschiedenen Lagerungen und Reaktionen zwischen Bakterien und Phagen veranschaulichen.

Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden an dem Mikroskop von Siemens (nach E. RUSKA und B. v. BORRIES, Typ UM 100b) des Institutes für Mikromorphologie, Berlin-Dahlem, durchgeführt. Herrn Dr. HEIMCKE danke ich für die lebenswürdige Unterstützung bei diesen Arbeiten. Die Schrägbedampfungen der Präparate wurden im Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie, Berlin-Dahlem, Abt. E. RUSKA, vorgenommen. Fräulein Anneliese STÜCKRATH danke ich besonders für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

[Eingegangen am 13. Juni 1952]

Schrifttum

- 1) HENNESSEN, W., Zschr. f. Mikroskopie **60**, 172 (1951).
- 2) HILLIER, J., G. Knaysi, R. F. Baker, Journ. Bact. **56**, 569 (1948).
- 3) KOTTMANN, U., Arch. f. Virusforschg. **2**, 388 (1942).
- 4) RAETTIG, H., Zbl. f. Bakt. I. Orig. **158**, 34 (1952).
- 5) RAETTIG, H., Zbl. f. Bakt. I. Orig. **158**, ... (1952) im Druck.
- 6) RUSKA, H., Erg. d. Hyg. Bakt. Immunforschg. u. exp. Ther. **25**, 437 (1943).
- 7) RUSKA, H., Hdb. d. Virusforschg. (Doerr-Hallauer) II. Erg. Bd. Wien **1950**.

Tafelerklärungen

Tafel I

Abb. 1. (Nr. 1411/51) Coli-Ruhr-Phage F 59 aus Menschendarmschleim auf *E. coli* A gezüchtet. Beispiel für mittelgroßen (etwa 60 m μ \varnothing) nichtgeschwänzten runden Phagen. Fast ausschließliche Adsorption an die Membranreste der zerstörten Zellen. 5 Std. auf Film bei 37° gewachsen, dann 15 Min. in Formalindampf fixiert. Vergrößerung: elektronenoptisch 1 : 5000, lichtoptisch weiter auf 1 : 15000

Abb. 2. (Nr. 1817/51) Coli-Ruhr-Phage F 60 (Kleinlochttyp) aus Menschendarmschleim aus *Sh. sonnei* E 225 gezüchtet. Langköpfiger, geschwänzter Phage in Einzellagerung. 3½ Std. auf Film bei 37° gewachsen, 15 Min. formalinfixiert. Vergr.: el. opt. 1 : 6000, lichtopt. auf 1 : 18000

Tafel II

Abb. 3. (Nr. 835/51) Polyvalenter Phage F 49 aus Rinderdarmschleim auf *Sh. sonnei* E 218 gezüchtet. Beispiel für einen in Lyse befindlichen Bakterien-Zellverband mit großem (etwa 75 m μ \varnothing) nichtgeschwänzten runden Phagen. 24 Std. auf Film bei 37° gewachsen, keine Fixierung. Vergr.: el. opt. 1 : 5000, lichtopt. auf 1 : 15000

Tafel III

Abb. 4. (Nr. 1819/51) Coli-Ruhr-Phage F 60 (Kleinlochttyp) aus Menschendarmschleim auf *Sh. flexneri* Y₂ gezüchtet. Innenstrukturiert erscheinender, ovaler (etwa 70 \times 110 m μ) geschwänzter Phage in Gruppen, auf Zellmembranresten liegend. Auffallend verschiedener Kontrast. 3½ Std. auf Film bei 37° gewachsen, 15 Min. formalinfixiert. Vergr.: el. opt. 1 : 6000, lichtopt. auf 1 : 18000

Abb. 5. (Nr. 148/52) Typhus-Sonnenschein-Diagnostikphage (Ruhr-Variante vom Großlochttyp) auf *Sh. dysenteriae* 6622 gezüchtet. Kleiner (etwa 45 m μ \varnothing) runder nichtgeschwänzter Phage an eine intakte Bakterienzelle gelagert, in der ungleich große schattengebende Strukturen ungeklärter Natur sichtbar sind. Präparationstechnik und Vergrößerung wie Abb. 4.

Tafel IV

Abb. 6. (Nr. 264/52) Dasselbe Präparat wie Abb. 5. Die Phagen an den Bakterien, die offenbar im Bersten begriffen sind, erscheinen auffallend kontrastarm. Präparationstechnik und Vergrößerung wie Abb. 4

Abb. 7. Eine andere Variante des in Abb. 5 und 6 dargestellten Phagen auf *Sh. dysenteriae* Schneider gezüchtet. Typische Lagerung der Phagen an und um die Bakterienzellen. Präparationstechnik und Vergrößerung wie Abb. 4

Abb. 8. (Nr. 1362/51) Polyvalenter Phage F 40 (Kleinlochttyp) aus Rindendarmschleim auf *Sh. sonnei* E 225 gezüchtet. Großer (etwa 75 m μ \varnothing) nichtgeschwänzter runder Phage, an Membranfetzen gelagert. 2½ Std. auf Film bei 37° gewachsen, 15 Min. formalinfixiert. Vergr.: el. opt. 1 : 5000, lichtopt. auf 1 : 15000

Tafel V

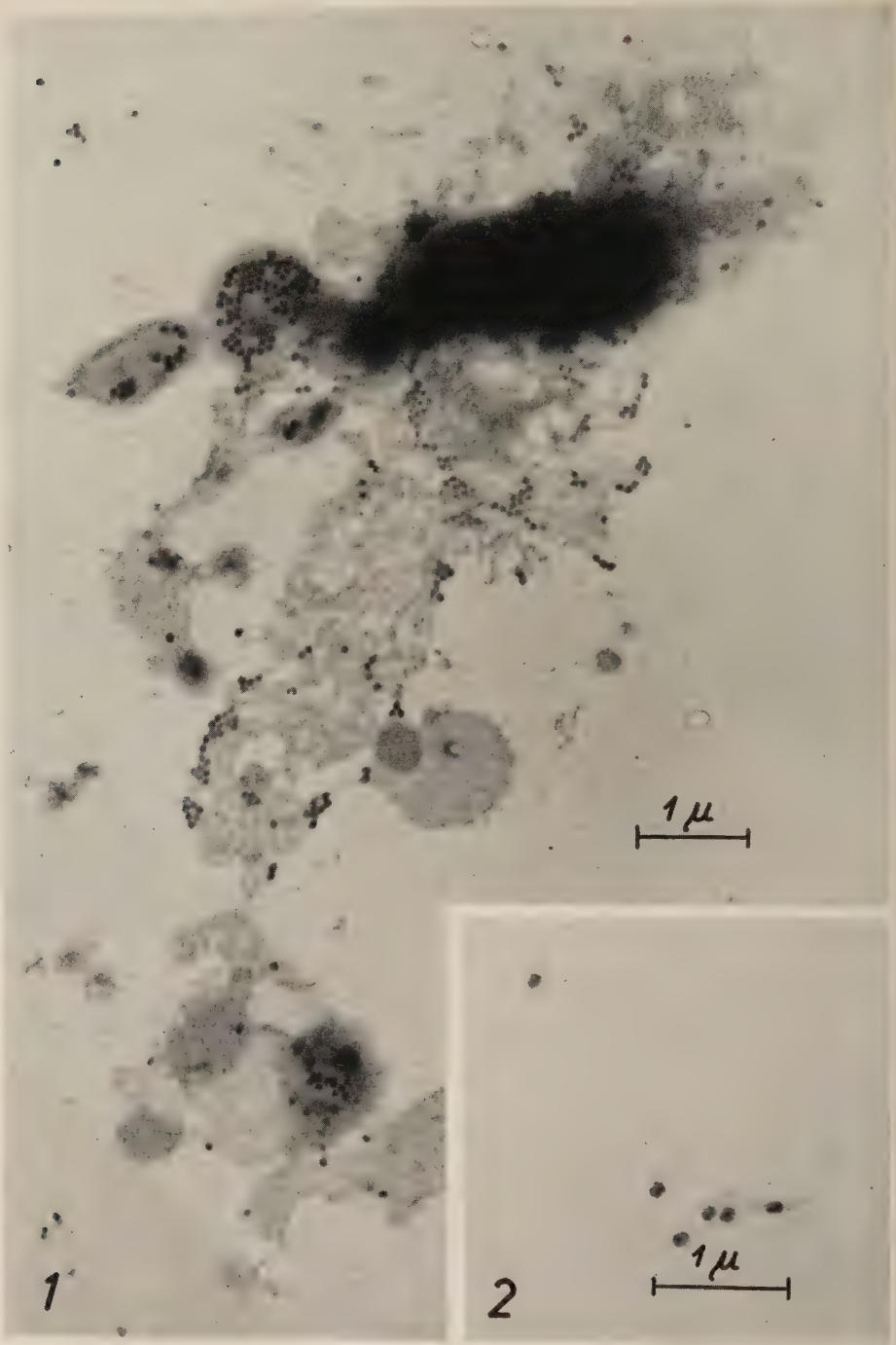
Abb. 9. (Nr. 2296/52) Coli-Ruhr-Phage F 60 (Großlochttyp) aus Menschendarmschleim auf *E. coli* B gezüchtet. Kleiner (etwa 45 m μ \varnothing) runder Phage mit sehr zartem langem (etwa 200 m μ) Schwanz einzeln und an Zellmembranen liegend. 24 Std. auf Film bei 37° gewachsen, unfixiert. Vergr.: el. opt. 1 : 7500, lichtopt. auf 22500

Tafel VI

Abb. 10. (Nr. 2416/52) Dasselbe Präparat wie Abb. 9 nach Bedampfung mit SiO₂. Vergr.: el. opt. 1 : 6000, lichtopt. auf 1 : 18000

Abb. 11. (Nr. 2433/52) Polyvalenter Phage F 21 aus Rattendarmschleim auf *E. coli* A gezüchtet. Runde Bakterienzelle und Membranfetzen besetzt mit einem kleinen (etwa 40 m μ \varnothing) nichtgeschwänzten runden Phagen. 3 Stunden auf Film bei 37° gewachsen, 15 Min. formalinfixiert. Vergr.: el. opt. 1 : 6000, lichtopt. auf 1 : 18000

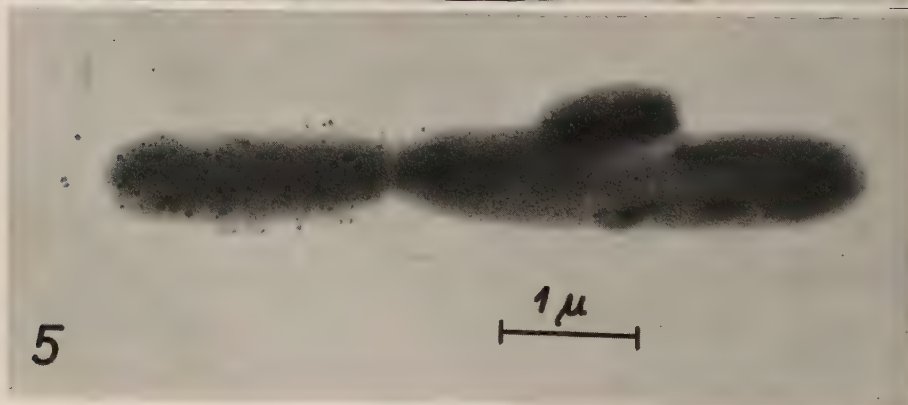
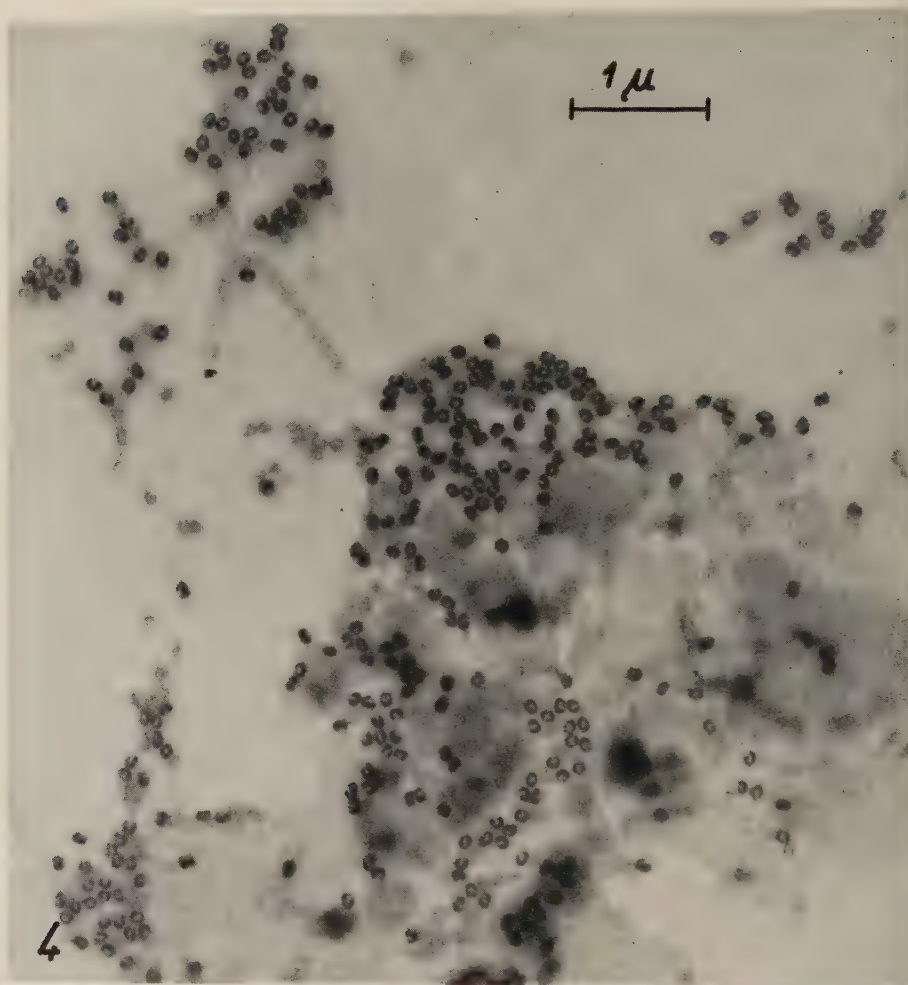
Abb. 12. (Nr. 2615/52) Dasselbe Präparat und dieselbe Zelle wie Abb. 11 nach Bedampfung mit SiO₂. Vergr.: el. opt. 1 : 5000, lichtopt. auf 1 : 18000



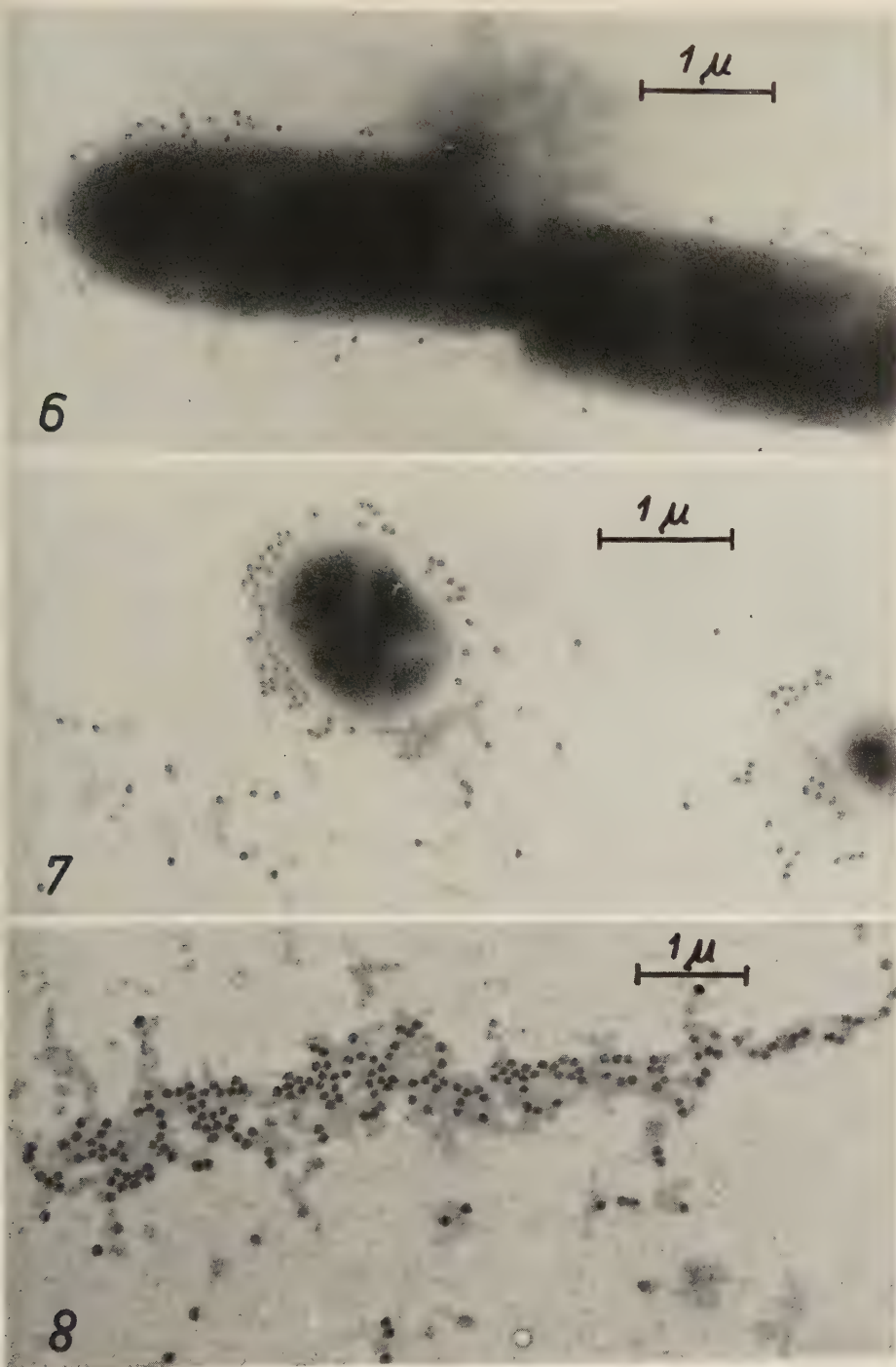
Tafel I, Abb. 1 u. 2



Tafel II, Abb. 3



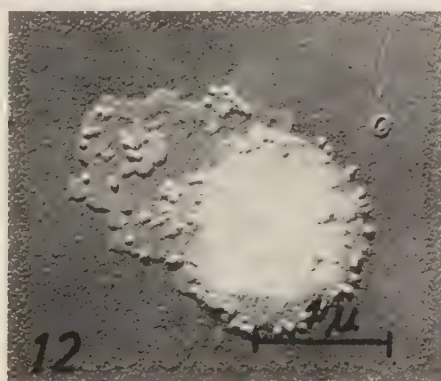
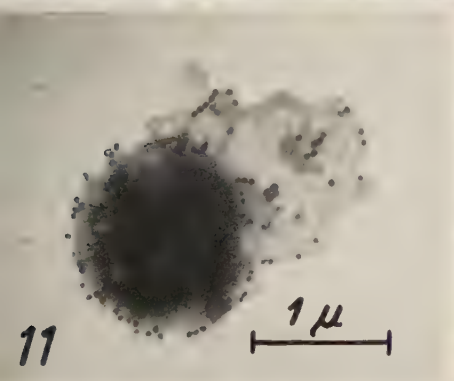
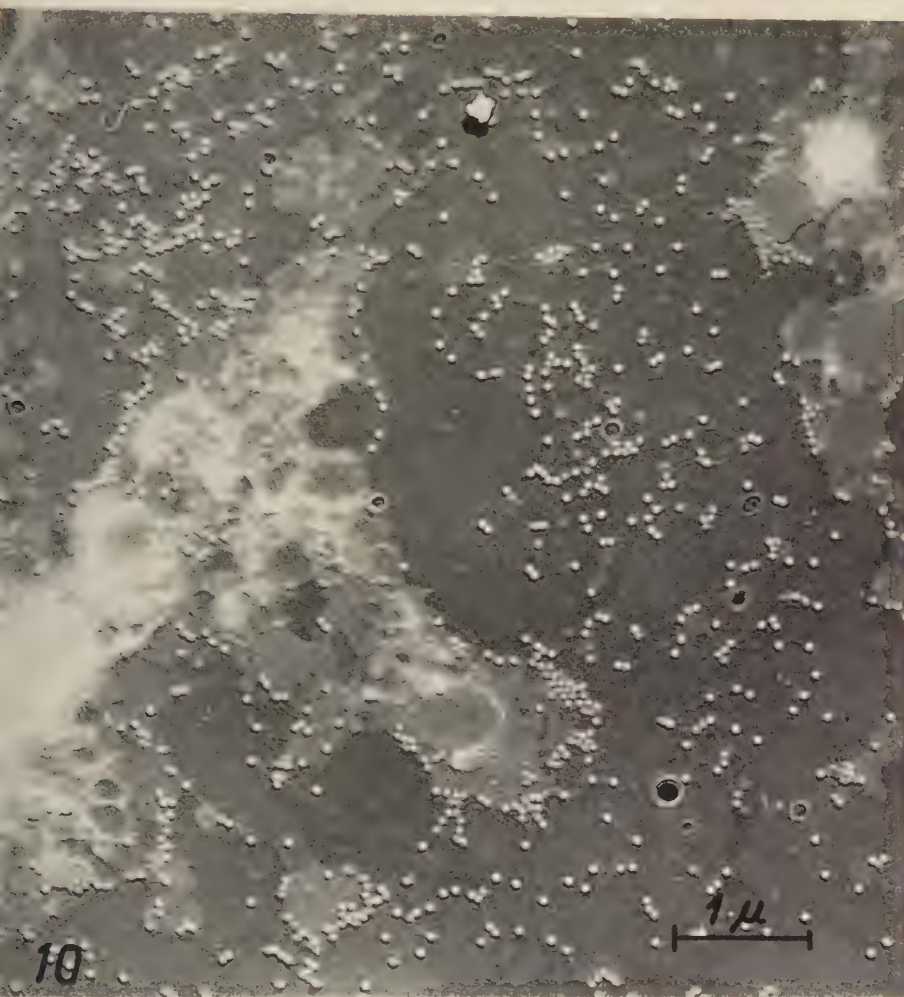
Tafel III, Abb. 4 u. 5



Tafel IV, Abb. 6—8



Tafel V, Abb. 9



Tafel VI, Abb. 10—12

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Magermilchgerinnung nach der Labung^{*)}

Von C. A. Baud, J. C. Morard und E. Pernoux

Mit 5 Abbildungen

Mit Hilfe einer speziellen Präparations-Methode (C. A. BAUD, J. C. MORARD und E. PERNOUX. C. R. Acad. Sci.; **233**; 276—277; 1951. —) konnten die morphologischen Phänomene der Gerinnung der Kuh-Magermilch unter dem Einfluß des Labfermentes im Elektronenmikroskop beobachtet werden¹⁾.

Die kurz nach Beginn der Einwirkung des Labes fixierten Präparate sind denen von H. NITSCHMANN (Helvet. chim. Acta; **32**, 1258, 1949) untersuchten Frischmilchpräparaten ganz ähnlich. Die Calcium-Caseinat-Teilchen sind annähernd kugelig und unregelmäßig verteilt; die meisten haben einen Durchmesser von 90 bis 125 Millimikron (Abb. A).

Etwas später zeigen die Partikel einen kleinen, feinfädigen Fortsatz, der sie gewissen Bakteriophagen ähnlich erscheinen läßt (Abb. B). Hernach reihen sie sich aneinander und verbinden sich mittels ihres Fortsatzes (Abb. C).

Dann heften sich die so entstandenen nodösen Fibrillen aneinander und bilden kleine Stränge; in jedem Strang sind die Ausbauchungen der Fibrillen, entsprechend den Partikeln, die sie gebildet haben, auf der ganzen Länge des Stranges in der gleichen Höhe angeordnet (Abb. D).

Schließlich nähern sich die Stränge gegenseitig oder heften sich sogar aneinander, verflechten sich und bilden ein ziemlich kompaktes, dreidimensionales Netzwerk; dies ist der Synärese-Prozeß (Abb. E).

Die von globulären Proteinen ausgehende Bildung von Fibrillen scheint ein ziemlich allgemeines Phänomen zu sein. Sie wurde bei der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung von C. v. Z. HAWN und K. R. PORTER (J. Exper. Med. **86**, 285, 1947 und **90**, 225, 1949), und bei der G-F Aktin Umwandlung von G. ROZSA, A. SZENT-GYÖRGYI und R. W. G. WYCKOFF (Bioch. Bioph. Acta **3**, 561, 1949) beobachtet. Möglicherweise kommen im Protoplasma gleichartige Phänomene vor, welche die morphologische Erscheinung der Sol-Gel Umwandlung darstellen; in der Tat zeigen die Elektronenbilder von M. BESSIS und M. BRICKA (Arch. Anat.

^{*)} Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 8. 6. 1952.

¹⁾ Die Beobachtungen wurden mit dem Elektronenmikroskop des Laboratoriums für elektronische Optik, Physikalisches Institut Lyon, Professor BERNARD, ausgeführt.

micr. 38, 190, 1949) solche lineäre Anordnungen von submikroskopischen kugelförmigen Partikeln im Cytoplasma der Blutzellen.

Der Synärese-Prozeß ist morphologisch gleichbedeutend mit dem von S. V. PERRY, R. REED, W. T. ASTBURY und L. C. SPARK (Bioch. Bioph. Acta 2, 674—694, 1948) für die Aktomyosine beobachteten Prozeß; dies ist eine intermolekulare Retraktion.

[Eingegangen am 20. Juni 1952]

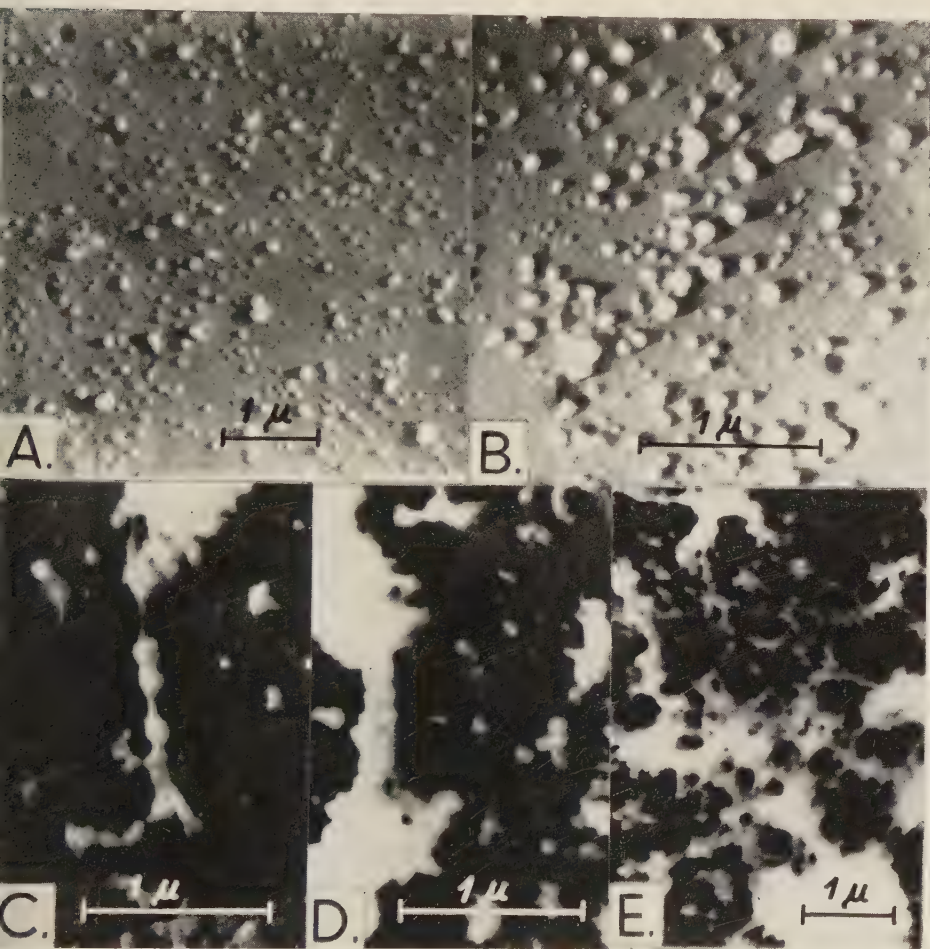


Abb. A. Calcium-Caseinat-Teilchen, 3 Minuten nach der Labung, 12000 ×
 Abb. B. Calcium-Caseinat-Teilchen, 6 Minuten nach der Labung, 24000 ×
 Abb. C. Calcium-Caseinat-Teilchen, 9 Minuten nach der Labung, 24000 ×
 Abb. D. Calcium-Caseinat-Teilchen, 12 Minuten nach der Labung, 24000 ×
 Abb. E. Calcium-Caseinat-Teilchen, 15 Minuten nach der Labung, 12000 ×

Abdruckverfahren zur Beobachtung von Holz im Übermikroskop*)

Mit 1 Abbildung

Es hat sich herausgestellt, daß es unter Vermeidung eines Doppel-Abdruckverfahrens auch mit einem direkten Abdruck möglich ist, die Faserstruktur des Holzes deutlich sichtbar zu machen.

Mit der Hand hergestellte Schnitte (ca. 0,1 mm dick) werden nach Entfernung von Harz (mit Benzen-Alkohol) und Lignin (mit Lauge und Natriumhypochlorid) auf ein Objektglas aufgelegt und Platin-beschattet. Danach wird das Präparat mit einer dünnen Kohleschicht versehen nach der Methode KÖNIGS¹⁾).

Das Holz wird aufgelöst, indem man das Präparat auf die Oberfläche von 96% iger Schwefelsäure bringt. Sobald die Zellulose sich bräunlich färbt, wird das Objekt auf destilliertes Wasser gebracht, bis Entfärbung auftritt. Diese Behandlung wird einige Male wiederholt, bis sich keine Färbung mehr zeigt. Die Zellulose ist innerhalb weniger Minuten gelöst. Der schwimmende Abdruck wird anschließend auf einen Objektträger gebracht.

Es wurden bisher nur Abdrucke von Kiefernholz hergestellt, wovon Abb. 1 ein Beispiel zeigt.

V. CH. DALITZ

Technisch Physische Dienst T.N.O. & T.H.
Delft — Niederlande

[Eingegangen am 13. Juni 1952]

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 9. 6. 1952.

¹⁾ H. KÖNIG und G. HELWIG: Z. f. Physik 129 (1951) 491.

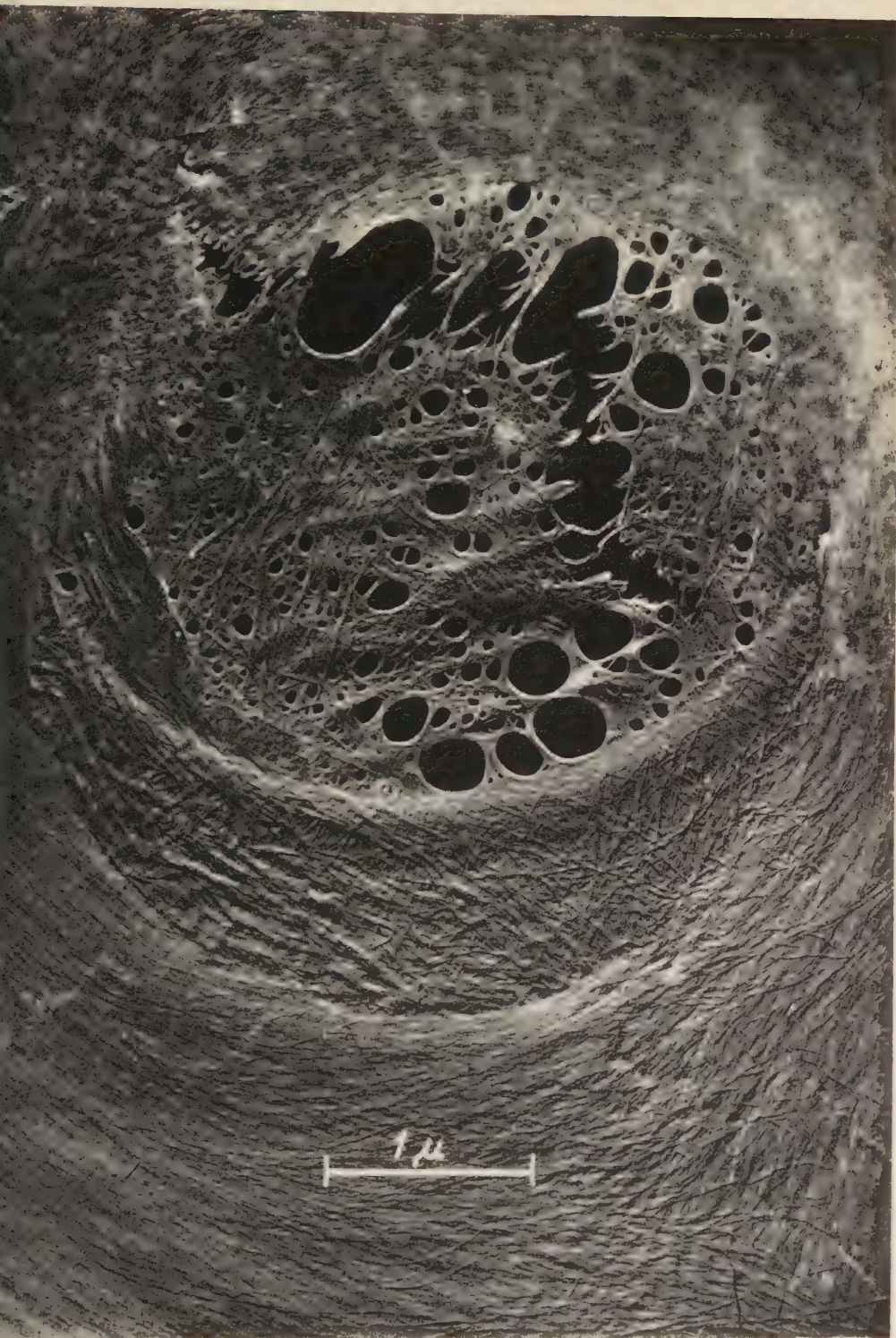


Abb. 1. Abdruck von Kiefernholz

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Foraminiferenschalen*)

Brigitte Jahn

Mit 9 Abbildungen

Foraminiferen sind einzellige Lebewesen (Protozoen), die zu allen Zeiten und in allen Meeren der Erde meist schwebend von der Strömung des Wassers umhergetrieben werden. Ihr protoplasmatischer Körper ist von einem äußerst zierlichen, fast immer gekammerten Gehäuse von artspezifischer Gestalt umschlossen (Abb. 1). Durch eine oder viele Poren dieser Schale kann das zähflüssige Protoplasma dünne, wurzelartige Fortsätze (Rhizopodien) in das umgebende Wasser hinausstrecken, um Sauerstoff und Nahrungspartikelchen aufzunehmen, sowie um den Reibungswiderstand für das Schweben im Wasser zu vergrößern. Die rezenten Formen erreichen eine Größe von etwa 20 μ bis zu mehreren Millimetern; aus vergangenen Erdperioden sind uns Formen mit Durchmesser bis zu einigen Zentimetern erhalten¹⁾.

Die Gehäuse können auf zweierlei Weise gebildet werden. Entweder durch Ausfällung kalkiger Verbindungen (Kalkspat) an der Oberfläche — den Schnecken und Muschelschalen vergleichbar — oder durch Einlagerung von geformten Substanzen, Fremdkörpern, wie Sandkörnchen oder Schalen und Schalentrümmern anderer Organismen in eine erhärtende, oft kalkhaltige Kittsubstanz²⁾.

Der Feinbau beider Schalentypen wurde von uns elektronenoptisch untersucht (Abdruckmethode, Wo-Oxyd-Bedampfung). Bei den aus Fremdstoffen zusammen-

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 9. 6. 1952.

¹⁾ REICHENOW: Lehrbuch der Protozoenkunde, Verlag Fischer, Jena 1929, S. 782.

²⁾ HARTMANN: Allgemeine Biologie, Verlag Fischer Jena, 1947, S. 99.

RHUMBLER: Zeitschr. f. wissensch. Zoologie, **52**, 1891.

RHUMBLER: Zeitschr. f. allg. Physiol. **1**/2, 1902.

Abb. 1. Rezente Foraminiferenformen 13,5 : 1

Abb. 2. Fremdkörpergehäuse 4000 : 1

Abb. 3. Organismisches Gehäuse 4000 : 1

Abb. 4. Organische Oberhaut mit Kanal 4000 : 1

Abb. 5. Organische Oberhaut, Kanäle abgerissen 4000 : 1

Abb. 6. Organische Kanäle einer fossilen Foraminifere 4000 : 1

Abb. 7. Poren einer Kalkschale durchziehende Kanäle 4000 : 1

Abb. 8. Entkalkte Kanäle mit Siebplatten 4000 : 1

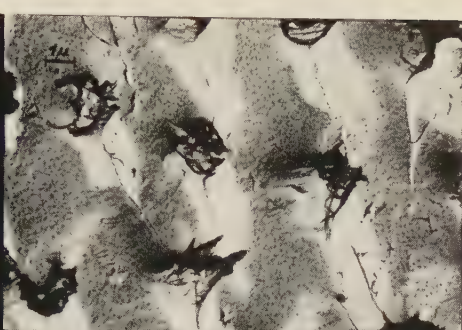
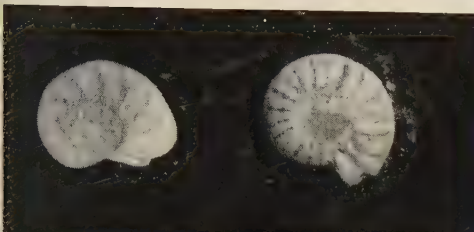


Abb. 5

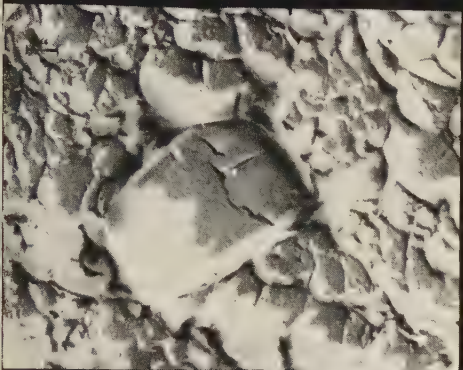


Abb. 6

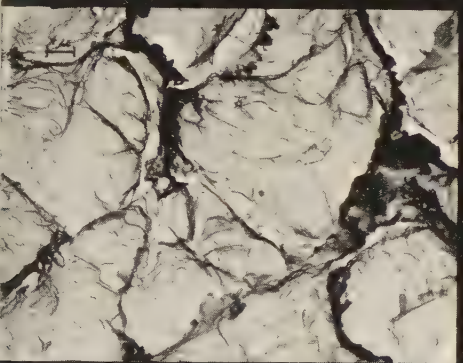


Abb. 7

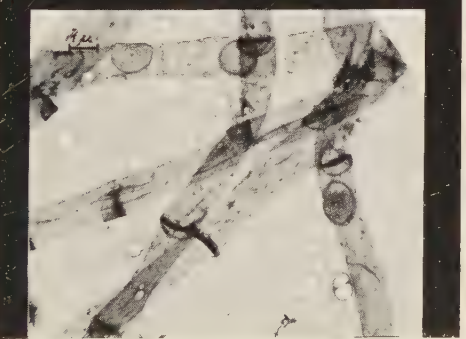
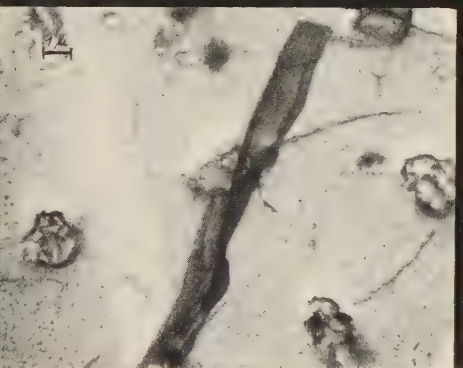


Abb. 8

gesetzten Schalen ist erwartungsgemäß keine streng gesetzmäßige Musterung zu finden, wohl aber eine lückenlose Sinterung der unregelmäßigen, groben bis feinen Körnchen (Abb. 2). — Die organismischen Kalkabscheidungen des anderen Schalentyps sind dagegen gesetzmäßig aufgebaut, wobei sich auf der Körperoberfläche einzelne gemusterte Abschnitte in bestimmter Weise abwechseln (Abb. 3).

Die Gehäuse fast aller kalkschaligen Organismen sind von dünnen Hüllen aus organischer Substanz umgeben (Protozoen, Mollusken, Echinodermen, dagegen nicht bei Brachiopoden). Diese Hüllen werden ontogenetisch noch vor der Kalkabscheidung von der lebenden Masse gebildet und sind das — allerdings äußerst zarte — Substrat, das durch die anorganischen Kalkverbindungen unterlagert und verfestigt wird³⁾. Sie schützen aber auch den Kalk mariner Organismen vor dem chemischen Angriff des Meerwassers.

Bei unseren elektronenoptischen Untersuchungen wurde diese Hülle auch sichtbar (an jenen Foraminiferenschalen, die aus organismischen Kalkabscheidungen aufgebaut sind), und zwar besonders dort, wo die Schale von feinen Poren durchbrochen ist (Abb. 4).

Durch die Abdrucktechnik wurde die organische Hüllschicht mit dem hierbei verwendeten Zaponlack von der Schale abgerissen, so daß nach Auflösung des Lackes die zarte Haut übrig blieb. An dieser Haut hafteten noch Schläuche gleichen Materials, die durch die Präparation aus den Poren der Schale herausgezogen worden waren. Nicht immer waren diese von größerer Länge, vielmehr zeigte es sich, daß die Schalenhülle an den Poren meist nur in Form von baumstumpfartigen Gebilden stehengeblieben war, die die Reste dieser abgerissenen, ins Innere des Zellkörpers weisenden Kanäle darstellten (Abb. 5).

Die organische Schalenhaut wurde mit ihren zarten Schläuchen auch bei fossilen Formen gefunden (Abb. 6); Abb. 7 läßt noch ihren Durchtritt durch die Poren der Kalkschale erkennen. Erstaunlicherweise sind also diese Kanäle aus dem frühen Tertiär, also über 50 Millionen Jahre, erhalten geblieben und verhinderten wohl die Zersetzung der Kalkschalen durch die Umwelteinflüsse.

Zur näheren Untersuchung der Kanäle wurden Schalen rezenter Foraminiferen entkalkt (1% HCl). In den hierdurch isolierten Schläuchen (Abb. 8) konnten in ziemlich regelmäßigen Abständen Siebplatten entdeckt werden, die eine gesetzmäßige Verteilung der Sieblöcher erkennen ließen, wie es die nach stereoskopischen Aufnahmen angefertigten Rekonstruktionszeichnungen (K. Bogen) zeigen (Abb. 9). Durch diese Befunde sind die früheren lichtmikroskopischen Ergebnisse von HOFKER und LE CALVEZ⁴⁾ nicht nur bestätigt, sondern auch erweitert worden. LE CALVEZ vermutete, daß die auch von ihm gesehenen Kanäle („pilier ectoplasmatique“) eine Querstruktur aus dunklen Scheiben („disques sombres“) aufweisen. Diese Scheiben sollen einen Stoffaustausch zwischen den einzelnen Kammern verhindern.

³⁾ JEAN LE CALVEZ: Arch. Zool. exp. et gén. **80**, 1938, S. 163.

⁴⁾ HOFKER: Siboga Expeditie IV, E. J. BRILL, Leiden 1927.

HOFKER: Pub. Staz. Zool. Napoli, **10**, 1930, S. 365—405.

LE CALVEZ, JEAN: Bull. du Lab. **29**, 1947, S. 1—4.

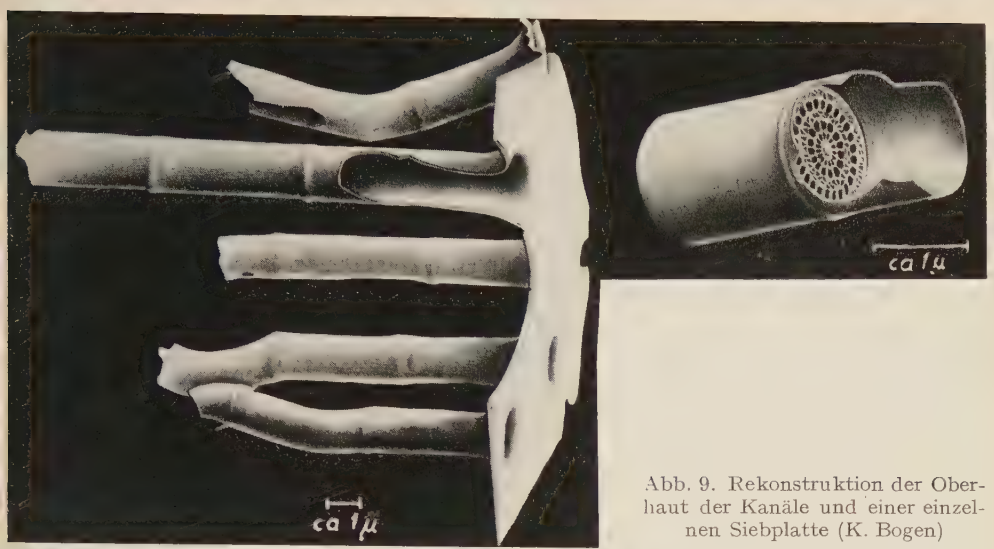


Abb. 9. Rekonstruktion der Oberhaut der Kanäle und einer einzelnen Siebplatte (K. Bogen)

Unsere Untersuchungen lassen jedoch die Annahme eines materiellen Austausches durch die Siebplatten berechtigt erscheinen.

Wenn man die Kanäle als Durchtrittstellen für die Pseudopodien annehmen könnte, so ist die Frage nach dem Zweck der in jedem Kanal rhythmisch eingeschalteten Siebplatten in erhöhtem Maße noch unbeantwortbar. Statt der erhofften Klärung eines alten Problems der Lichtmikroskopie tauchen auch hier neue Strukturen auf, die uns das Walten der Natur selbst in den kleinsten Dimensionen eines einzelligen Lebewesens als unfaßbares Wunder erscheinen lassen. „Die menschliche Wissenschaft gleicht einer Kugel, die ununterbrochen wächst. In dem Maße, wie ihr Umfang zunimmt, wächst auch die Zahl ihrer Berührungspunkte mit dem Unbekannten“ (PASCAL).

Meinen Mitarbeitern, Fräulein GUDRUN WERMBTER und Herrn RICHARD RAU, danke ich herzlich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Präparationen. Herr Prof. HOFKER (Den Haag) hat mir freundlicherweise wertvolle Hinweise für die Arbeit gegeben.

Liebenswürdigerweise wurde uns das fossile Material von Herrn Dr. HILTMANN, Hannover, und das rezente von Herrn Prof. SCHELLENBERG, Zoologisches Museum, Berlin, zur Verfügung gestellt.

[Eingegangen am 1. August 1952]

Istituto Superiore di Sanità (Direttore Prof. D. MAROTTA)
Istituto di Anatomia Patologica dell' Università' (Direttore Prof. G. BOMPIANI)
Istituto di Clinica Chirurgica dell' Università' (Direttore Prof. R. PAOLUCCI)
Roma

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Wand lyophilisierter Arterien*)

Erste Beobachtungen über die Adventitia

Von Prof. Dr. **Giovanni Lelli**, Dr. **Alberto Bonanome**, Dr. **Mirella Sappa**

Mit 7 Abbildungen

In dieser Mitteilung beschreiben wir, als Teil einer Gruppe von Untersuchungen an Bindegewebe im Trockenzustand, kurz einige elektronmikroskopische Beobachtungen über lyophilisiertes Bindegewebe.

Die Lyophilisation ist eine neue Methode der Austrocknung durch Gefrieren (FLOSSDORF), die anderen Methoden vorzuziehen ist, wenn es sich um empfindliche Substanzen, wie Eiweißstoffe, Fette, Enzyme, Vitamine, Plasma und Blutserum, Antibiotika und eiweißartige Hormone, handelt (CAPRA).

Im Wesentlichen ist das Verfahren wie folgt: Die Substanz wird gefroren und dann in ein hohes Vakuum gebracht. Das gefrorene Lösungsmittel wird dann bei einer Temperatur, die den Gefrierzustand erhält, sublimiert. Schließlich wird die Temperatur erhöht um die verbliebene Feuchtigkeit auszutreiben.

Die auf diese Weise getrockneten Gewebe zeichnen sich durch ihren niedrigen Feuchtigkeitsgehalt aus. Dieser ist gewöhnlich unter 2% und läßt sich mit anderen Mitteln nur durch eine übermäßige Temperatursteigerung erreichen.

Neuerdings wird die Lyophilisation auch in der Zytologie und in der Histologie zur Austrocknung biologischer Präparate benutzt.

Unsere Untersuchungen sind an einige Monate im Trockenzustand gehaltenen Stückchen von gesunder lyophilisierter Aorta des Hundes gemacht worden.

Nach einigen Stunden in bidestilliertem Wasser sehen die Stückchen wieder wie frisches Gewebe aus. Wir haben die Adventitia abgetrennt, um mit dem Elektronenmikroskop die Struktur ihrer Kollagenfibrillen zu studieren.

Zweck der Untersuchung war, nachzusehen, ob die Lyophilisation zu Strukturveränderungen führt und sie dann als Methode für die Konservierung des Kollagens für elektronenmikroskopische Untersuchungen, je nachdem, entweder anzunehmen oder abzulehnen.

Um eventuelle Strukturunterschiede gegenüber Kollagenfibrillen aus nicht lyophilisierter Aortenadventitia zu entdecken, haben wir Stückchen beider Ge-

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 9. 6. 1952.

webeproben zunächst denselben technischen Verfahren zur guten Trennung der Fibrillen von der Grundsubstanz unterworfen.

Das Untersuchungsmaterial wurde dann in drei Gruppen verteilt.

In der ersten Gruppe wurden die Stückchen Adventitia der Wirkung einer Lösung von Hyaluronidase (LELLI und MAROTTA) ausgesetzt.

Der Diffusionsfaktor, in einer Konzentration von 250 viskosimetrischen Einheiten in 3 ccm Lösung, wirkte eine Stunde auf das Gewebe ein, in einigen Fällen bei einer Temperatur von 31° C und in anderen bei 18° C während der Zerzupfung.

In einer zweiten Gruppe wurde das Material in bidestilliertem Wasser zerzupft und eine Stunde auf 40° C gehalten (LELLI).

In der dritten Gruppe wurde die Zerzupfung in einer 10%igen Lösung von CaCl_2 bei einem pH von 4,5, das 21 Stunden einwirkte, ausgeführt nach einer Modifikation des von PARTRIDGE benutzten Verfahrens.

Die elektronenmikroskopische Beobachtung des so behandelten Gewebes zeigte Folgendes:

In der ersten und zweiten Gruppe zeigten die Kollagenfibrillen des lyophilisierten Gewebes immer ganz klar die charakteristische periodische Struktur (Abb. 1) und wiesen niemals eine bemerkbare Veränderung des Durchmessers auf.

In einer beträchtlichen Anzahl von Präparaten aus lyophilisiertem und frischem, zur Kontrolle benutztem, Gewebe haben wir mit einem Komparator die Dicke der Fibrillen und die Breite der Periode gemessen. Mit diesen Werten haben wir die durchschnittliche Dicke und die durchschnittliche Breite der Periode errechnet. Es ergaben sich Werte, die keinerlei Unterscheidung gestatteten zwischen den beiden Geweben und die sich im Rahmen des von den verschiedenen Autoren als normal angesehenen hielten. (HALL, JAKUS und SCHMITT, WOLPERS, GROSS und SCHMITT, LELLI und MAROTTA, HUBER und ROUILLER usw.)

Dagegen haben wir in der dritten Gruppe bemerkenswerte Unterschiede zwischen frischem und lyophilisiertem Gewebe gefunden.

Durch die Wirkung der CaCl_2 Lösung zeigte der größte Teil der Kollagenfibrillen des lyophilisierten Gewebes mehr oder weniger ausgesprochene Veränderungen, von der einfachen Aufschwellung (Abb. 2) bis zu der mehr oder weniger vollständigen Verunstaltung der Fibrille (Abb. 3 und 4), häufig von einer Art Verdrehung begleitet (Abb. 5).

Es ist wichtig zu bemerken, daß die transversale periodische Struktur in völliger Klarheit auch in den am meisten geschädigten Fibrillen erhalten bleibt.

Diese Veränderungen sind, morphologisch gesehen, sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch mit denen, hervorgerufen durch die Einwirkung von sauren Lösungen (WYCKOFF, LELLI und MAROTTA).

Die beschriebenen Veränderungen fehlen vollständig in den Fibrillen des nicht lyophilisierten Kollagens der Kontrollen (Abb. 6).

Die Messungen des Durchmessers und der Periodenbreite von zahlreichen lyophilisierten, aber nicht aufgequollenen, Fibrillen (Abb. 7) ergaben Durchschnittswerte, die ganz den von anderen Autoren als Normalwerte angegebenen entsprachen.

Diesen Ergebnissen kann man folgende Überlegungen entnehmen.

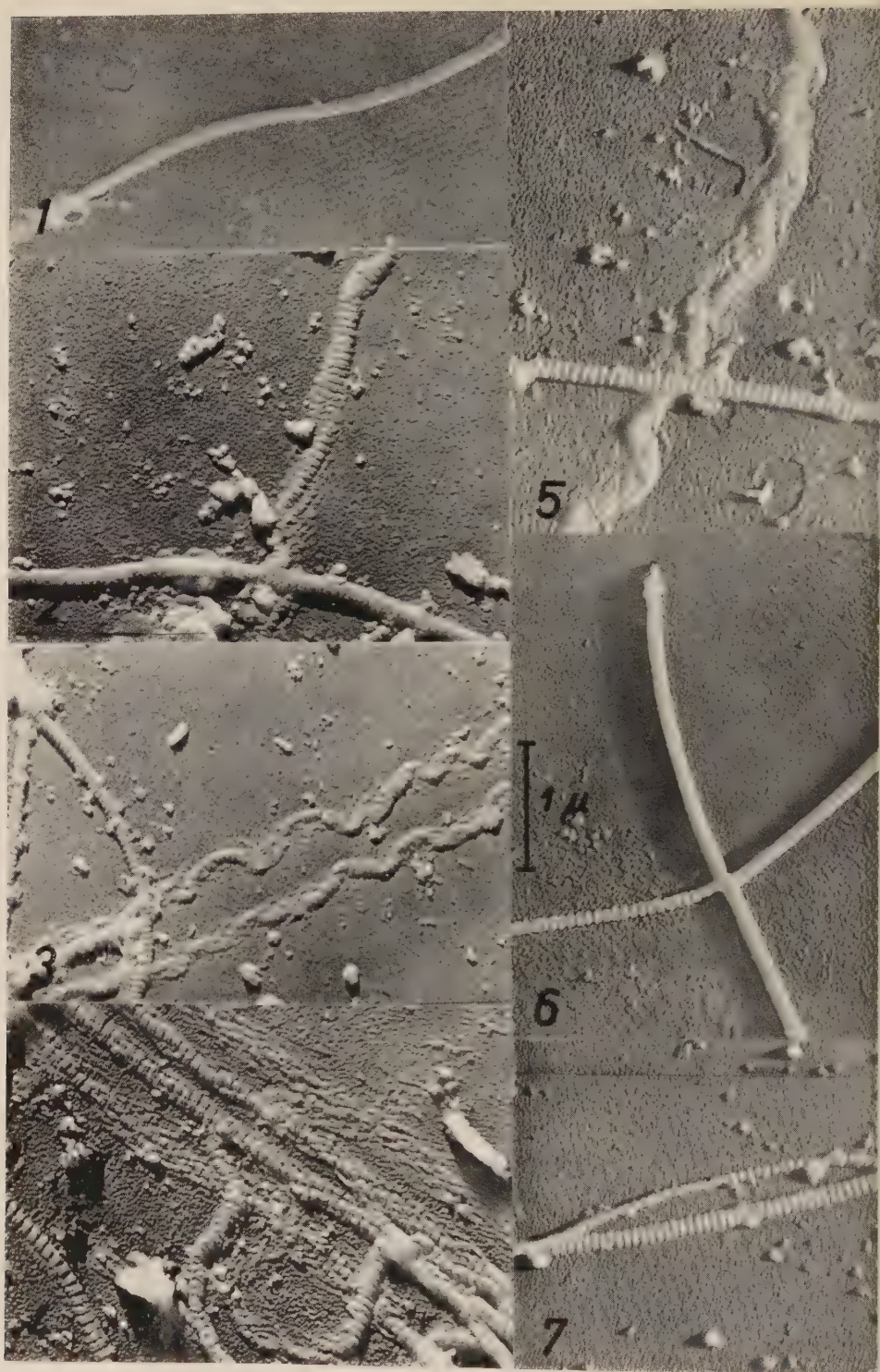


Abb. 1—7. Kollagenfibrillen

Die Lyophilisation ruft im Bindegewebe, zum mindesten nach unseren Untersuchungen, keine elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderung der Fibrillenstruktur hervor, aber wohl eine Veränderung des Verhaltens gegenüber gewissen Chemikalien. — Dies ist aus verschiedenen Gesichtspunkten interessant.

1. Im allgemeinen Sinne hinsichtlich einer immer tieferen Erkenntnis der Nachwirkung der Lyophilisation, die zu rein wissenschaftlichen wie auch industriellen und rein praktischen Zwecken heute weitgehend angewandt wird. Man denke nur an die Präparate aus menschlichem Normalserum, an die einzelnen Serumfraktionen, die nach der Austrocknung ihre Löslichkeit und ihre biologische Wirksamkeit länger als ein Jahr behalten, an das Meerschweinchenkomplement, daß sich nach der Austrocknung eine Anzahl von Jahren hält, an die Konservierung der Enzyme, der Viren, der bakteriologischen- und Virus-Vakzine, an die Konservierung von Fruchtsäften, in denen nicht nur der Geschmack und der Geruch, sondern auch der Vitamingehalt unverändert bleibt.

2. Besonders wichtige Beziehungen bestehen bezüglich der experimentellen Probleme der Transplantationen, die man heute mit lyophilisierten Gefäßstückchen macht (NATELLIS, NATELLIS und VISALLI, WEISS, BONANOME und BEGANI). Tatsächlich könnte die Kenntnis einer Veränderung des physikalisch-chemischen Verhaltens einiger Bestandteile der Wand des lyophilisierten Gefäßes für das Studium des Schicksals des transplantierten Materials wichtig sein.

3. Ganz besonders interessiert es den Elektronenmikroskopiker, der daraus erfährt, daß die Lyophilisation als Mittel zur Konservierung des Kollagens, zum mindesten für gewisse Untersuchungen, benutzt werden kann.

Zusammenfassung

Die Autoren haben einige Stückchen der Adventitia von lyophilisierter Aorta und von frischer Aorta elektronenmikroskopisch untersucht um festzustellen, ob die Lyophilisation irgendwelche Veränderungen des Kollagens hervorruft.

Während ihre Ergebnisse eine strukturelle Veränderung ausschließen, zeigen sie, daß das lyophilisierte Gewebe sich gewissen Chemikalien gegenüber anders verhält.

Diese Ergebnisse sind wichtig für ein besseres Verständnis der Wirkungen der Methode der Lyophilisation, besonders in Bezug auf experimentelle Studien an Transplantaten aus lyophilisiertem Gewebe und für die Konservierung des Kollagens für elektronenmikroskopische Forschung.

Schrifttum

- CAPRA, Il Farmaco 5, 741 (1950). — FLOSDORF, Freiz-drjng. Reinhold p. Corporation (1949). — GROSS u. SCHMITT, J. Exp. Med. 5, 555 (1948). — HALL, JAKUS u. SCHMITT, J. Am. Chem. Soc. 64, 1234 (1942). — HUBER u. ROULLER, Experientia 7, 338 (1951). — LELLI, Atti 52^o Congr. Soc. It. Med. Int. 78 (1951). — LELLI u. MAROTTA, Rend. Ist. Sup. San. 13, 503 (1950). — LELLI u. MAROTTA, Rend. Ist. Sup. San. 13, 518 (1950). — LELLI u. MAROTTA, Acta Un. Int. Cancer 4, 695 (1951). — LELLI u. MAROTTA, Ztschr. Wiss. Mikr. 60, 359 (1952). — NATELLIS, Atti Soc. Rom. Chir. Dicembre (1951). — NATELLIS u. VISALLI, Arch. It. Chir. 74, 328 (1951). — PARTRIDGE, Bioch. J. 43, 387 (1948). — WEISS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51, 277 (1943). — WEISS, J. A. M. A. 124, 1063 (1944). — WOLPERS, Virch. Arch. 312, 292 (1944). — WOLPERS, Das Leder 1, 3 (1950). — WYCKOFF, Electron Microscopy. Interscience N. Y. London 1949.

[Eingegangen am 9. Juni 1952]

Was können elektronenmikroskopische Bilder über den Vorgang der Verkieselung fossiler Hölzer aussagen?*)

Von Ruth Eicke, TU Berlin

Mit 8 Abbildungen

Die heutige Lichtmikroskopie ermöglicht uns mit tausendfachen Vergrößerungen eine schnelle Charakterisierung und damit oftmals eine systematische Einordnung von fossilen Pflanzen. Ein verkieseltes Holz, das uns zur Betrachtung vorlag, konnte als ein Glyptostroboxylon, eine mit den Taxodien verwandte Gattung, identifiziert werden. Die Gefäße sind Tracheiden, in ihrer Breite je nach Frühholz oder Spätholz etwas schwankend. Die Hoftüpfel stehen einzeln oder zu je zwei in gleicher Höhe gegenüber (Abb. 1, 2). Ihr Durchmesser beträgt 12—14 μ . Saniosche Balken treten zwischen ihnen als Versteifungen auf. An den Markstrahlen sind runde, z. T. etwas ovale Tüpfel festgestellt worden. Eine Wandstruktur ist im Lichtmikroskop nicht zu erkennen. Die Trockenpräparate zeigten bei schrägem Lichteinfall im Hoftüpfel eine schwache Streifung (Abb. 3).

Die Phasenkontrastmikroskopie ließ bei vielen Hoftüpfeln einen dunklen Ring um die Innenfläche, den Torus, erkennen, hervorgerufen durch eine von der übrigen Zelle abweichende Lichtbrechung (Abb. 4). Diese Erscheinung läßt das Vorhandensein einer Ausfüllung des Hoftüpfels, einen Steinkern, vermuten. Eine Bestätigung dieser Hypothese erbrachte die Herstellung von Präparaten für elektronenmikroskopische Aufnahmen. Auf den Abdruckfolien werden nämlich schwarze, runde, nicht durchstrahlbare Flächen wahrgenommen (Abb. 5). Sie hatten die Größe des Hoftüpfelinnenraumes und lagen auch an ihren Stellen. Sie wurden, da sie nicht fest im Gefüge verhaftet waren, mit der Folie herausgehoben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen brachten erstmalig Einblicke in das Zellengefüge dieses verkieselten Holzes. Die Zellwandelemente sind parallel angeordnet und rufen in den glatten hoftüpfelfreien Zellwänden eine schrägliegende Paralleltextur hervor (Abb. 6, 7). Anders ist es bei den Hoftüpfeln (Abb. 8). Die Textur des Torus ist regellos. Um den Torus lagert sich die Margo mit einer radialen Streifung, vermutlich Fibrillenbündel, über deren verbindende Elemente man noch nicht entscheiden kann. Der wulstartig ausgebildete äußere Rand besteht aus konzentrisch gelagerten Fibrillen. Die konzentrische Anordnung der Kieselsubstanz ist bei den Bildern besonders gut zu erkennen. Die Abbildungen ähneln damit den Hoftüpfeln vom frischen Holz der Kiefer, deren Torus ebenfalls keine ausgezeichnete Richtung in ihrer Anlage erkennen läßt; sie hat auch die radiale Textur auf der Margo und die konzentrische Anordnung der Fibrillen im äußeren Rand. Die vorher erwähnten Hoftüpfelsteinkerne wurden auch bei Abbildungen, die nach dem

*) Vortrag auf der 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Tübingen am 9. 6. 1952.

Königschen Abbildungsverfahren mittels einer Kohlehaut hergestellt waren, wiedergefunden und zeigten eine regellose Anordnung. Der Steinkern hat also die Hoftüpfelinnenwand nicht auf seiner Oberfläche abgebildet, was zu der Schlußfolgerung führen kann, daß der Steinkern immer lose in dem Hoftüpfelinnenraum gelegen hat. Das erwähnte Herausheben mit der Folie zeigt ebenfalls die lockere Verbindung zwischen Steinkern und Hoftüpfel.

Wir erhielten den Einblick in den Aufbau dieses verkieselten Holzes durch Anwendung folgender Technik:

Der Stamm von *Glyptostrobus* aus einem tertiären Basalttuff ist brüchig, da die Mittellamellen der Zellen nicht verkieselt und durch Inkohlung und Verwitterungseinwirkung zerfallen sind. Da eine Durchstrahlung des Materials wegen seiner hohen Dichte nicht möglich ist, wurden die schon erwähnten Abdruckverfahren angewandt. Wegen der Brüchigkeit kann die Abdruckfolie nicht fest aufgedrückt werden, so daß Textur und Struktur nicht vollständig zur Abbildung kamen und nur die größten Höhendifferenzen wiedergegeben wurden. Ein Stück des Stammes wurde mit Einbettungsmittel zur Herstellung eines Anschliffes eingekocht und konnte für Abdrücke verwandt werden. Auch dabei blieben Teile der Substanz an der Folie (Zaponlack) haften. Das Abbildungsverfahren mittels einer Kohlehaut nach KÖNIG brachte dagegen klare Wiedergaben. Die verkieselten Zellen wurden nach der Herstellung der Kohlehaut mit konzentrierter Flußsäure herausgelöst. Bei lohnenden Objekten wurde eine Schrägbedampfung mit Wolframoxyd (unter einem Winkel von 30°) vorgenommen. Andere Versuchsanordnungen, sowie weitere fossile Hölzer werden in den laufenden Untersuchungen bearbeitet.

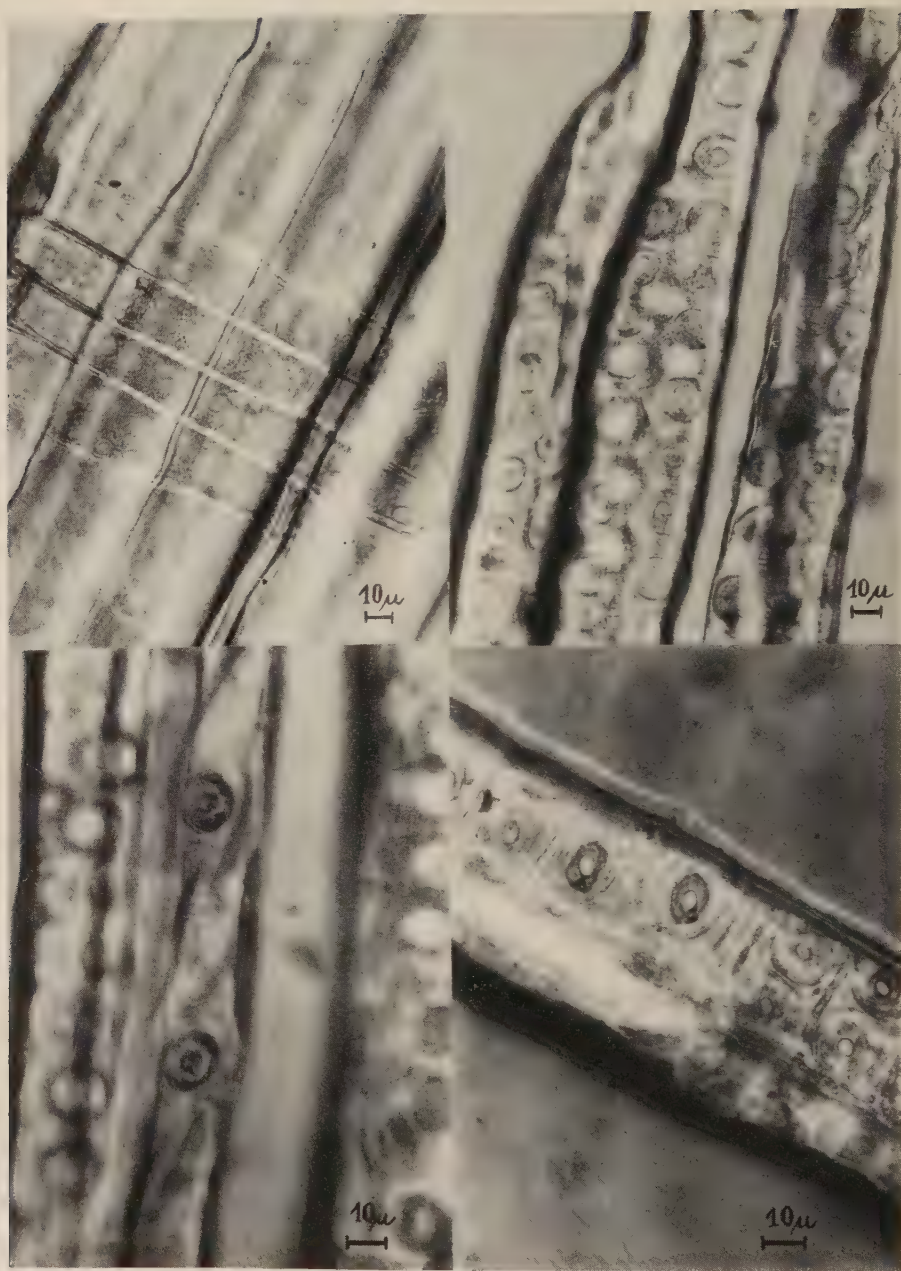
Die Ergebnisse lassen sich in folgende drei Punkte zusammenfassen: Die Zellwand zeigt

1. eine Paralleltextur,
2. eine konzentrische Anlage der Kieselsubstanz des Hoftüpfelrandes und eine radiale Textur der Schließhaut,
3. eine Ausfüllung des Hoftüpfels mit einem Steinkern.

Wenn man in Betracht zieht, daß sowohl die Paralleltextur der Zellwand als auch die spezifische Textur der Hoftüpfel mit dem Aufbau der Zellwand und der Hoftüpfel der Tracheiden rezenter Hölzer übereinstimmen, möchte man den Schluß ziehen, daß es sich hier um einen molekularen Austausch der Zellulose gegen Kieselsäure handelt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden zum ersten Male die morphologischen Verhältnisse erkannt, die die genannte Versteinungstheorie unterstützen, wie sie auch HELLMERS in seiner Arbeit „Über den Vorgang der Verkieselung“ erörtert hat. Ob es sich bei dem Vorgang um eine Infiltration von Kieselsäure handelt oder ob eine chemische Reaktion stattgefunden hat, konnte bisher nicht festgestellt werden.

Herrn Prof. Gothan möchte ich für viele anregende Aussprachen und Hinweise danken. Ich konnte diese Arbeit durch das lebenswürdige Entgegenkommen von Herrn Prof. E. Ruska und seinen Mitarbeitern in seinem Institut im Kaiser-Wilhelm-Institut in Dahlem ausführen.

[Eingegangen 7. 7. 1952]



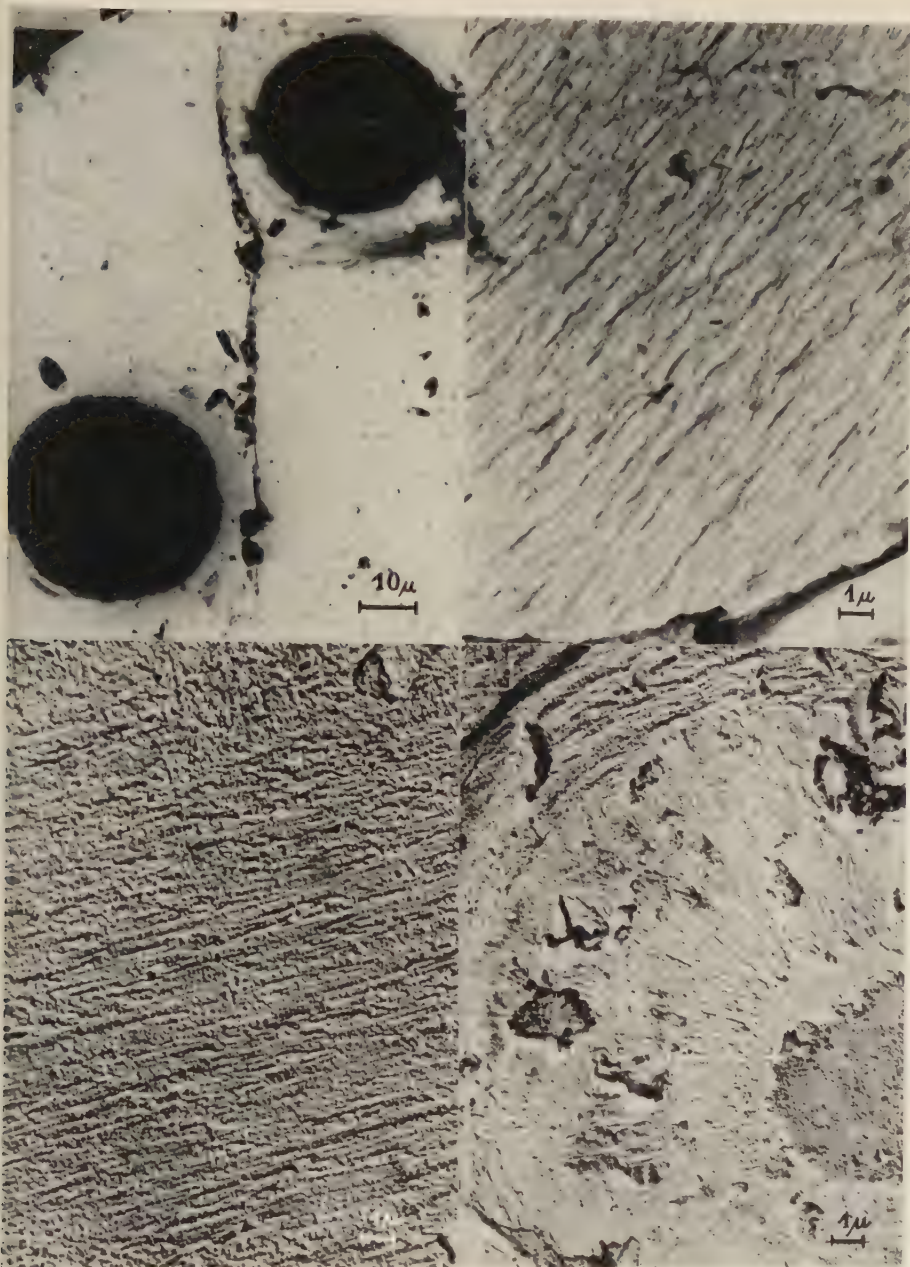
Glyptostrobus, verkieselt Basalttuff, Tertiär

Abb. 1. Tracheiden, Markstrahlzellen LM 500: 1

Abb. 2. Tracheiden LM 500: 1

Abb. 3. Tracheiden, Trockenpräparat LM 750: 1

Abb. 4. Tracheiden, Phasenkontrast 750: 1



Glyptostrobus, verkieselt Basalttuff, Tertiär

Abb. 5. Zellen mit Hof-tüpfelsteinkern, Abdruck ÜM 1000: 1

Abb. 6. Paralleltextur der Zellwand, Kohlehaut ÜM 6000: 1

Abb. 7. Paralleltextur der Zellwand, Kohlehaut, bed. WO_3 ÜM 6000: 1

Abb. 8. Hof-tüpfel, Kohlehaut, bed. WO_3 ÜM 6000: 1

Schrifttum der Elektronenmikroskopie

(5. Folge)

Herausgegeben von B. v. Borries und H. Ruska

H. Ergebnisse aus technischen Forschungsgebieten

H 1. Allgemeines und Übersichten

1635. *Mee, A. J.*: Applications of physics in chemical industry. J. Sci. Instruments 20, 137 (1943).
1636. *Huggin, M. L.*: Photography of crystal structures. J. Chem. Phys. 12, 520 (1944).
1637. *Fisher, R. B.*: Electron microscope as a tool in chemical research. Trans. III. State Acad. Sci. 38, 74 (1945).
1638. *Gulbransen, A., Phelps, R. T., und Langer, A.*: A use of the electron microscope in chemical microscopy. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 17, 646 (1945).
1639. *Sulzer Laboratory*: From the work of the Sulzer Laboratory for testing materials. V. Investigations with the electron microscope. Sulzer Tech. Rev. 1, 138 (1945).
1640. *Boeke, J.*: Electrical measuring instruments in chemistry during the war. Chem. Weekblad. 42, 230—237 (1946).
1641. *Gulbransen, E. A.*: New developments in the study of surface chemistry. Met. Progr. 49, 553 (1946).
1642. *Rees, A. L. G.*: The electron microscope and its industrial applications. Proc. Soc. Chem. Ind. Victoria 46, 794—813 (1946).
1643. *Dohnalek, R., und Rozsival, M.*: Elektronenoptik in der technischen Praxis (tschechisch). Chem. Obzor. 23, 63 (1948).
1644. *Keenan, A. G., und Holmes, J. M.*: The adsorption of nitrogen, argon, and oxygen on potassium chloride at 78—90° C. J. phys. coll. Chem. 53, 1309—1319 (1949).
1645. *Polukarow, M. N.*: Ultramikroskopische Untersuchung der Elektrolyse von Silbernitrat. J. allg. Chem. UdSSR 19, 1583—1595 (1949).
1646. *Szawlewicz, S. A.*: Utilization of the electron microscope and infrared spectrophotometer for the examination and testing of materials Rpt. 424526, Naval Air Material Center, Exp. Sta., Philad., Pa. (1949).
1647. *Ames, J., Cottwell, T. L., und Sampson, A. M. D.*: An electron microscopy study of crystal surfaces. Trans. Faraday Society 46, 938—941 (1950).
1648. *Clews, C. J. B.*: Metallurgical applications of the electron microscope. Nature 165, 390—393 (1950).
1649. *Habraken, L.*: ZnS-Pulver-Untersuchungen durch Elektronenmikroskopie und -beugung. Rev. univ. (9), 6, 65—71 (1950).
1650. *Mathieu-Sicaud, A. E.*: Precipitation du paratungstate d'ammonium en milieu eau-alcool. Proc. Conf. Electron Microscopy Delft Juli 1949, S. 170—171 (1950).
1651. *Rozsival, M., Vesely, S., und Chodorowski, J.*: Die Anwendung der Elektronenmikroskopie in der Metallographie (polnisch). Prace G.I.M.O. No. 2, 81—87 (1950).
1652. *Strebing, R., und Orth, E.*: Eine neue Verwendung des Elektronenmikroskopes in der analytischen Chemie. Sitzber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. IIb 159, 254—259 (1950).
1653. *Beyersdorfer, K.*: Anwendung des Elektronenmikroskopes in der anorganischen Chemie. Fortschr. d. Chem. Forsch. 2, H. 1 (1951).
1654. *Vernon, L. W., und Milligan, W. O.*: The crystal structure of rutilelike heavy metal orthovanadates. Texas J. Science No. 1, 82—85 (1951).
1655. *Williams, P. S.*: Some effects on the flow of concentrated suspensions of variations in particle size and shape. Discussions Faraday Society No. 11, 47—55 (1951).
1656. *Bernard, R., Pernoux, E., und Teichner, S.*: Bestimmung der spezifischen Ober-

- fläche pulverförmiger Stoffe mit dem Elektronenmikroskop. Z. wiss. Mikroskop. Technik 60, 419—421 (1952).
1657. *Grasenick, F.*: Die Bedeutung der Übermikroskopie für den Chemiker und Betriebstechniker. Siemens-Zeitschrift 26, 172—178 (1952).
1658. *Greenland, K. M.*: The microscope in industry. Nature 169, 231—232 (1952).
- ## H 2. Metall- und Metalloxydkolloide
1659. *Fuller, M. L.*: Twinning in zinc oxide. J. appl. Phys. 15, 164 (1944).
- 1659a. *Cuckow, F. W.*: The form of particles of nickel produced by the carbonyl process. J. Roy. Micro. Soc. 65, 23 (1945).
1660. *Schechter, A., Roginski, S. Z., und Issajew, B. M.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Katalysatoren. I. Asbest als Träger. Acta Physiochim. UdSSR 20, 217—226 (1945).
1661. *Zettlemoyer, A. C., und Walker, W. C.*: Active magnesia. Surface areas and pore structures from nitrogen adsorption. Ind. Eng. Chem. 39, 69 (1947).
1662. *Harris, L., und Siegel, B. M.*: A study of gold smokes with the electron microscope. J. appl. Phys. 19, 123 (1948).
1663. *Harris, L., McGinnies, R. T., und Siegel, B. M.*: Preparation and optical properties of gold blacks. J. Opt. Soc. America 38, 582—589 (1948).
1664. *Heller, W., Wojtowicz, W., und Watson, J. H. L.*: Isothermal and non-isothermal transformations of tactoid-forming particles of tungstic acid. J. Chem. Phys. 16, 998 (1948).
1665. *Kopelman, B., und Gregg, C. C.*: The pore size of hydrogen-reduced tungsten powder. Proc. A. I. M. E. Metals Tech. TP 2324 August 1948.
1666. *McMurdie, H. F., und Golovato, E.*: Study of the modification of manganese dioxide. J. Research Nat. Bur. Standards 4, 589—600 (1948).
1667. *Duwez, P., Odell, F., und Taylor, J. L.*: Recrystallization of beryllium oxide bodies at 2000° C. J. Amer. cer. Soc. 32, 1 (1949).
1668. *Geiling, S., und Richter, H.*: Die amorphe Phase von Arsen. Acta Crystallographica 2, 305—308 (1949).
1669. *Turkevich, J., und Hillier, J.*: Electron microscopy of colloidal systems. Analytical Chemistry 21, 475—485 (1949).
1670. *Watson, J. H. L., Heller, W., und Wojtowicz, W.*: Comparative electron and light microscopic investigations of tactoid structures in V_2O_5 -sols. Science 109, 274—278 (1949).
1671. *Anderson, R. B.*: Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Metalloxyden und Metalloxydkatalysatoren. J. phys. Colloid Chem. 54, 505—519 (1950).
1672. *Brochin, J. S., und Burssuk, L. M.*: Untersuchung von Metallpulvern im Elektronenmikroskop. Betriebslabor UdSSR 16, 1331—1335 (1950).
1673. *König, H.*: Zur Veränderung von Kristallen im Elektronenmikroskop. Optik 7, 261—262 (1950).
1674. *Vold, R. D., Coffey, H. F., und Baker, R. F.*: Direct observation of gel structure with the electron microscope. J. Coll. Sci. 5, 586—588 (1950).
1675. *Cowley, J. M., Rees, A. L. G., und Spink, J. A.*: The morphology of Zinc oxide smoke particles. Proc. Phys. Society 64, 638—655 (1951).
1676. *König, H.*: Zur Veränderung von MoO_3 -Kristallen im Elektronenmikroskop. Z. f. Physik 130, 483—492 (1951).
1677. *Rideal, E.*: Size and shape factor in colloidal systems. Discussions of the Faraday Society No. 11, 9—10 (1951).
1678. *Takagi, R.*: An electron microscope and diffraction study of metallic smoke. J. Phys. Soc. Japan 6, 204 (1951).
1679. *Takagi, R.*: Electron microscope and diffraction studies of chromic oxides. J. Phys. Soc. Japan 6, 350—351 (1951).
1680. *Takagi, R.*: Electron microscope and diffraction studies of metallic smoke. J. Mech. Lab. Tokyo 5, 107—110 (1951).
1681. *Turkevich, J., Stevenson, P. C., und Hillier, J.*: A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discussions of the Faraday Society No. 11, 55—75 (1951).
1682. *Eberspächer, O.*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an aktiven aus verschiedenen Hydraten hergestellten Aluminiumoxyden. Z. wiss. Mikroskop. mikrosk. Technik 60, 393—396 (1952).
1683. *Hanser, E. A., und LeBeau, D. S.*: The surface structure and properties of colloidal silica and alumina. J. Phys. Chem. 56, 136—139 (1952).
1684. *Rhodes, R. G.*: Twinning structures in crystals of tungsten trioxide. Nature 170, 369 (1952).

H 3. Kohle, Ruß, Graphit

1685. *Preston, G. D., und Cuckow, F. W.:* Electron micrographs of coal. Proc. Conf. Ultra-fine-Struct. Coals and Cokes BCURA, Juni 1943.
1686. *Wiegand, W. B., und Ladd, W. A.:* Electron microscope studies on colloidal carbon. Rubber Chem. Techn. 15, 664 (1943).
1687. *McCartney, J. T.:* Determination of the size distribution of fine coal particles by the electron microscope. U. S. Bur. Mines, Rep. Invest. 3827, 1—11 (1945).
1688. *Benson, G.:* Acetylene black on rubber. Rubber Age 58, 461—465 (1946).
1689. *Dobbin, R. E., und Rossman, R. P.:* Mechanical processing of carbon blacks, resultant effects in GR-S compounds. Ind. Eng. Chem. 38, 1145—1148 (1946).
1690. *Boadway, J. D.:* Observations of carbon crystal structure. J. appl. Phys. 19, 1191 (1948).
1691. *Hofmann, U., und Ohlerich, G.:* Oberflächenchemie des Kohlenstoffs. Angewandte Chemie 62, 16—21 (1950).
1692. *Meldau, R.:* Grundzüge einer elektronenoptischen Analyse von Kohlenmembran und -asche. Bergbau-Archiv 11, 1—10 (1950).
1693. *Sharpe, J. W., und Hounam, R. F.:* General techniques for the examination of airborne dusts with the electron microscope with special reference to coal dusts. Proc. Conf. Electron Microscope, Delft Juli 1949, S. 186—188 (1950).
1694. *Watson, J. H. L., Vanpee, M., und Lind, S. C.:* The solids condensed from carbon monoxide by alpha particles. J. phys., coll. Chem. 54, 391—401 (1950).
1695. *Meldau, R.:* Electron microscope investigation of diamond powders. Ind. Diamond Rev. 11, 7—8 (1951).
1696. *Meldau, R., und Robertson, R. H. S.:* An electronoptical study of type I and type II diamonds. Industrial Diamond Review 11, 251—253 (1951).
1697. *Meldau, R.:* Ein Modell des Ultrafeinbaus, besonders der Magerkohle. Bergbau-Archiv 12, 87—96 (1951).
1698. *Mennenöh, S.:* Die elektronenmikroskopische Abbildung von Kohleoberflächen mit Hilfe des Polymerisations-Abdruckverfahrens. Bergbau-Archiv 12, 97—98 (1951).
1699. *Sawamura, H.:* On the electron microscope structure of the graphite and temper carbon in cast iron. Memoirs of the Faculty of Engineering Kyoto Univers. 13, 209—212 (1951).
1700. *Boult, E., Thirsk, H. R., und Blayden, H. E.:* Nature of the solution obtained by Pyridine extraction of coal. Nature 170, 317—318 (1952).
1701. *Donnet, J. B., und Boissier, J.:* Sur la détermination de la forme et de la dimension des particules de noir de carbone par microscopie électronique C. R. Acad. Sci. Paris 234, 195—198 (1952).
1702. *Klimenok, B. W., und Schechter, A. B.:* Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Koks, der sich beim Cracken von Kohlenwasserstoff an den Aluminiumsilikat-Katalysatoren bildet. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 83, 109 (1952).
1703. *Lueg, W., und Treptow, K. H.:* Schmierstoffe und Schmierstoffträger beim Ziehen von Stahldraht. Stahl und Eisen 72, 399—416 (1952).
1704. *Maggs, F. A. P., Dryden, I. G. C., Nagelschmidt, G., und Cartwright, J.:* Accessible surface areas of coals. Nature 169, 269—271 (1952).
1705. *Smith, T. D.:* Amorphous carbon. J. Chem. Soc. 923—927 (1952).

H 3a. Sonstige Staube und Rauche

1706. *Burton, C. J.:* Electron microscope studies of the capture of airborne particles by single fibers. Nature 152, 540 (1943).
1707. *Schechter, A. B., Roginski, Ss. S., und Issajew.:* Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rauchniederschlägen. Iswestija Akad. Wiss. Abt. chem. Wiss. 322, (1945).
1708. *Schechter, A. B., Roginski, Ss. S., und Ssacharowa, Ss.:* Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rauchniederschlägen. Iswestija Akad. Wiss., Abt. chem. Wiss. 491—495 (1946).
1709. *Schechter, A. B., und Roginski, Ss. S.:* Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Rauchniederschlägen. Acta Physicochim. UdSSR 21, 463 (1946).
1710. *Trillat, J. J., und Laloëuf, A.:* Étude de la structure des fumées de chlorure d'ammonium par diffraction et microscopie électroniques. C. R. Acad. Sci. Paris, 227, 67—69 (1948).
1711. *Dautrebande, L., Kahler H., und Mitchell, B. L.:* Differentiation under the electron microscope of SiO₂ and NaCl crystals. Arch. Intern. Pharmacodynamie 80, 171—177 (1949).

1712. McCabe, L. C., Mader, P. P., McMahon, H. E., Hämming, W. J., und Chaney, A. L.: Industrial dusts and fumes in the Los Angeles area. Ind. Eng. Chem. 41, 2486—2493 (1949). —
1713. Cable, R. D., Rubin, S., Glassbrook, C. I., und Magill, P. L.: Identification of particles in Los Angeles smoke by optical and electron microscope. Arch. ind. Hyg. occup. Med. 2, No. 6, 698 bis 715 (1950).
1714. Dautrebande, L.: Influence of temperature on the micellar size of salt aerosols. Nature 166, 546—547 (1950).
1715. König, H.: Elektronenmikroskopie des Staubes. Jötten-Gärtner, Die Staublungen-Erkrankungen, Wiss. Forschungsberichte 60, 188—194 (1950).
1716. Cadle, R. D., und Magill, P. L.: Preparation of solid- and liquid -in air suspension for use in air pollution studies. Industr. Eng. Chem. 43, 1331—1335 (1951).
1717. Geld, P. W., Buinow, N. N., und Lerinman, R. M.: Untersuchung von Rauchniederschlägen von Siliziumoxyd mit Hilfe des Elektronenmikroskops. Isvestija. Akad. Wiss. UdSSR, physikal. Ser. 15, 366 (1951).
1718. König, H.: Elektronenoptische Präparationsverfahren für Feinstäube und Untersuchungsergebnisse. Z. VDI 93, 1122, Dezember Nr. 36 (1951).
1719. Lépine, P., und Croissant, O.: Étude morphologique au microscope électronique des particules submicroscopiques d'amiante contenues dans l'air. Ann. Inst. Pasteur 80, 305—308 (1951).
1720. Eiji Suito, Masafumi Arakawa und Natsu Uyeda: Untersuchungen über ultrafeine Pulver für den industriellen Gebrauch mit Hilfe des Elektronenmikroskops und der Elektronenbeugung. Bull. Inst. chem. Res. Kyoto Univ. 24, 74 (1951).
1721. Wilkinson, P. G.: The properties of evaporated gold and tungsten oxides. J. appl. Phys. 22, 226—232 (1951).
1722. de Haas, E.: Tests on dust separators with the Siegbahn-Schönander electron microscope. Ark. Fys. 4, 415—421 (1952).
1723. Meldau, R.: Handbuch der Staubtechnik. I. Band — Grundlagen. Deutscher Ingenieur-Verlag GmbH., Düsseldorf, 1952.
1724. Meldau, R., und Robertson, R. H. S.: Morphologische Einflüsse auf technische Staubeigenschaften. Ber. DKG und VDEfa 29, 27—35 (1952).

H 4. Mineralien, insbes. Tone; keramische Stoffe

1725. Inuzuko, I. H.: The use of electron microscope in the study of clay. J. Geol. Soc. Japan 48, 391 (1941).
1726. Nelson, R. A., und Hendricks, S. B.: Specific surface of some clay minerals, soils and clay colloids. Soil Sci. 56, 285 (1943).
1727. Whiteside, E. P.: A mineralogical and chemical investigation of some clay fractions of Putman silt loam. Thesis, Univ. Missouri, 113, (1944).
1728. Kitaigorodski, J. J.: Das Elektronenmikroskop und Strukturuntersuchungen an keramischen Materialien. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 48, 563 (1945).
1729. Bachman, G. S., Fisher, R. B. und Badger, A. E.: Observation of gold particles in glass with the electron microscope. Glass Ind. 27, 399—422 (1946).
1730. Cogan, H. A., und Setterstrom, C. A.: Properties of ethyl silicate. Chem. Eng. News 24, 2399—2501 (1946).
1731. Stringham, B.: Tinticite, a new mineral from Utah. Am. Mineral. 31, 395—400 (1946).
1732. Jackson, M. L., Mackie, W. Z., und Pennington, R. P.: Electron microscope applications in soils research. Proc. Soil. Sci. Soc. America 11, 57—63 (1947).
1733. Mackie, W. Z., Chatterjee, B., und Jackson, M. L.: Mineral crystal forms in soils observed in the electron microscope; I. Single-component clays and synthetic mixtures. Proc. Soil. Sci. Soc. America 12, 176—179 (1947).
1734. Pease, D. C.: The disappearance of salt from glass ice during low-temperature dehydration and its implication in electron microscopy. Science 106, 543 (1947).
1735. Pennington, R. P., und Jackson, M. L.: Segregation of the clay minerals of polycomponent soil clays. Proc. Soil Sci. Soc. America 12, 452—457 (1947).
1736. Bates, T. F., und Black, M. V.: Electron microscope investigation of opal glass. Glass Ind. 29, 487—492; 516 bis 518 (1948).
1737. Callaghan, E.: Endellite deposits in Gardner Mine Ridge. Lawrence County, Indiana Dept. Conservation. Div. Geology, Ind. Bull. 1 (1948).

1738. *Comeforo, J. E., Fisher, R. B., und Bradley, W. F.*: Mullitization of kaolinite. *J. Am. Ceram. Soc.* 31, 254—259 (1948).
1739. *Fisher, R. B.*: Selected applications of the electron microscope in ceramic research. *J. appl. Phys.* 19, 123 (1948).
1740. *Forslind, E.*: Crystal structure and water absorption of clay minerals. Swedish cement and concrete Research Institute, Royal Inst. of Technology, Stockholm 1948, Bull. Nr. 11
1741. *Bates, T. F.*: The electron microscope applied to geological research. *Trans. New York Acad. Sci. Ser. 2*, 11. No. 4, 100—107 (1949).
1742. *Bowen, N. L., und Tuttle, O. F.*: The system $MgO-SiO_2-H_2O$. *Bull. Geol. Soc. Am.* 60, 439—460 (1949).
1743. *Marshall, C. E.*: The colloid chemistry of the silicate minerals. *Agronomy. I. Acad. Press. Inc. Publishers, N. Y.* (1949).
1744. *Mathieu-Sicaud, A., und Levasseur, G.*: Dispersion des suspensions argileuses aux ultrasons. Interprétation des résultats au microscope électronique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 228, 393 (1949).
1745. *Rigby, G. R.*: Application of crystal chemistry to ceramic materials. *Brit. Ceram. Soc.* 48, 1—67 (1949).
1746. *Bates, F. T., Hildebrand, F. A., und Swinford, A.*: Morphology and structure of Endellite and Halloysite. *Am. Mineral.* 35, 463—484 (1950).
1747. *Bates, F. T., Sand, L. B., und Mink, J. F.*: Tubular crystals of chrysotile asbestos. *Science* 111, 512—513 (1950).
1748. *Champeix, J., und Bouleville, J.*: Étude au microscope électronique des corps asbestosiques et des fibres d'amiant. *Arch. Mal. prof.* 11, 607—612 (1950).
1749. *Ebert, L., und Fiale, R.*: Ein neuer anorganischer Faserkristall. *Sitzber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. Abt. IIb*, 159, 414—418 (1950).
1750. *Kantzer, M., und Mezdard, M.*: Mit Hilfe des Elektronenmikroskops aufgenommene Photographien eines Kie-selsäuregels. *Bull. Soc. franc. Céram.* 37—41 (1950).
1751. *Noll, W., und Kircher, H.*: Zur Morphologie des Chrysotilasbestes. *Naturwiss.* 37, 540—542 (1950).
1752. *Beyersdorfer, K.*: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rubin-gläsern. Sprechsaal für Keramik-Glas-Email 84, Nr. 10 (1951).
1753. *Hofmann, U.*: Halloysit im Hörte-witzer Kaolin. Sprechsaal für Keramik-Glas-Email 84, Nr. 20 (1951).
1754. *Hofmann, U.*: Die Gestalt der Ton-mineralteilchen im Elektronenmikro-skop. *Jahrbuch für Keramik-Glas-Email* 37, (1951/52).
1755. *Iwanow, A. A.*: Ein Versuch der An-wendung der elektronenmikroskopi-schen Methode zur Untersuchung von Erzmineralien. *Schr. mineral. Ges. UdSSR* (2) 80, 167—174 (1951).
1756. *Kempcke, E., Priehäuser, M., und Hof-mann, U.*: Der Amberger Kaolin. Sprechsaal für Keramik-Glas-Email 84, Nr. 3—4 (1951).
1757. *König, H.*: Untersuchung von Glas mit Elektronen. *Glastechnische Berichte* 24, 167—171 (1951).
1758. *Nakahira, M., Iwai, S., und Suzuki, A.*: Some observations on the clay mine-rals, kaolinite and halloysite, by the x-ray and electron microscopy. *J. Sci. Res. Inst.* 45, 23—137 (1951).
1759. *Radczewski, O. E.*: Über den Mineral-bestand des feuerfesten Schiefertons von Neurode in Schlesien. *Berichte Deutsche Keramische Gesellschaft* 28, 119—138 (1951).
1760. *Schulz, L. G.*: Polymorphism of Cesium and Thallium halides. *Acta Cryst.* 4, 487—489 (1951).
1761. *Weiß, A., und Hofmann, U.*: Faseriger Vermikulit von Kropfmühl bei Passau. *Acta Albertina* 20, 53—57 (1951/52).
1762. *Beyersdorfer, K.*: Methoden und Er-gebnisse der elektronenmikroskopi-schen Abbildung von Glasoberflächen. *Glas- und Hochvakuum-Technik* 1, 8—15 (1952).
1763. *Hofmann, U.*: Neue Erkenntnisse auf dem Gebiete der Thixotropie, insbeson-dere bei tonhaltigen Gelen. *Kolloid-Z.* 125, 86—99 (1952).
1764. *McDowall, L., und W. Vose*: Sedimen-tation of halloysite. *Nature* 170, 368 (1952).
1765. *Noll, W., und Kircher, H.*: Zur Morpho-logie der Chrysotilasbestfaser. *Die Naturwiss.* 39, 158—159 (1952).
1766. *Noll, W., und Kircher, H.*: Veränderun-gen von Chrysotilasbest im Elektronen-mikroskop. *Die Naturwiss.* 39, 188 bis 190 (1952).
1767. *Pfefferkorn, G., und Westermann, H.*: Untersuchung topochemischer Reak-tionen an Kalkspat. *Z. wiss. Mikro-skop. mikroskop. Technik* 60, 397 bis 401 (1952).

1768. *Radczewski, O. E.*: Elektronenmikroskop und thermische Analyse als Hilfsmittel zur Bestimmung der Tonminerale in Böden. Z. f. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde 57, 66—69 (1952).
 1769. *Shdanow, S. P.*: Vergleichende Untersuchung der Struktur von porösen Gläsern nach Absorptionsmethoden und mit dem Elektronenmikroskop. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 82, 281—284 (1952).
- ### H 5. Dünne Schichten
1770. *Aron, A.*: Dünne Metallfilme. Ann. Phys., Paris 1, 361 (1946).
 1771. *Cabrera, N.*: Struktur dünner Filme. C. R. Acad. Sci. Paris 222, 950 (1946).
 1772. *Dankow, P. D.*, und *Ignatow, D. W.*: Die Struktur von anodischen Schichten, die sich auf Aluminium bei Sauerstoff-Gasentladung bilden. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 54, 235 (1946).
 1773. *Gulbransen, A.*, *Phelps, R. T.* und *Hickman, J. W.*: Oxide films formed on alloys at moderate temperature. Electron diffraction and electron microscope study. Ind. Eng. Chem. 18, 640 (1946).
 1774. *Lotmar, W.*: Crystallite magnitudes in thin antimony films. Helv. Phys. Acta 19, 234 (1946).
 1775. *Phelps, R. T.*, und *Hickman, J. W.*: Oxide films formed on metals and alloys at moderate temperatures. Ind. Eng. Chem. (Analytical Edit.) 18, 391 (1946).
 1776. *Phelps, R. T.*, *Gulbransen, E. A.*, und *Hickman, J. W.*: Electron diffraction and electron microscope study of oxide films formed on metals and alloys at moderate temperatures; stripped oxide films of metals. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18, 391—400 (1946).
 1777. *Epstein, H. T.*: Electron microscopy of monolayers. Bull. Amer. Phys. Soc. 23, 6 (1948).
 1778. *Frimer, A. I.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Antimon-Caesium-Schichten. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 63, 255—257 (1948).
 1779. *Demenjew, N. W.*, *Buinow, N. N.*, und *Miljutina, M. I.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Struktur von Palladiumhäutchen, welche sich auf der Oberfläche wäßriger Metallsalzlösungen durch die Wirkung reduzierender Gase bilden. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 73, 751 (1950).
 1780. *Gulbransen, A.*: Fortschritte im Studium der Oberflächenoxydation von Metallen und Legierungen bei hohen Temperaturen. I und II. Rev. de Met. 45, 181, 287 (1948).
 1781. *Epstein, H. T.*: On the structure of monolayers and multilayers of polar hydrocarbon molecules on solid substrates. J. Phys. Coll. Chem. 54, 1053 bis 1066 (1950).
 1782. *Hass, G.*, und *Scott, N. W.*: The structure and properties of some metal and metal oxide films. J. Phys. Radium 11, 394—402 (1950).
 1783. *Tazaki, H.*, und *Kuwabara, S.*: A study of sulphide films on copper by electron diffraction. J. Sci. Hiroshima Univ. 14, 251—254 (1950).
 1784. *Farnsworth, H. E.*, und *Clarke, E. N.*: Effects of thin films of silver and of gas at the surface of the (100) face of a silver crystal. Phys. Rev. 81, 651 (1951).
 1785. *Hiesinger, L.*, und *König, H.*: Optik und Struktur kathodenzerstäubter Schichten unter besonderer Berücksichtigung der Reaktion mit dem Restgas. Aus der Festschrift der W. C. Heraeus GmbH., Hanau aus Anlaß ihres 100jährigen Bestehens am 1. 4. 1951.
 1786. *Holland, L.*: The production, properties and uses of thin films condensed in vacuo. Vacuum 1, 23—36 (1951).
 1787. *Kainuma, Y.*: Structure of thin metallic films formed by evaporation on molybdenite. J. Phys. Soc. Japan 6, 135—138 (1951).
 1788. *König, H.*, und *Helwig, G.*: Über dünne aus Kohlenwasserstoffen durch Elektronen- oder Ionenbeschuß gebildete Schichten. Z. f. Physik 129, 491—523 (1951).
 1789. *Menter, J. W.*, und *Tabor, D.*: Orientation of fatty acid and soap films on metal surfaces. Proc. Roy. Soc. A 204, 514 (1951).
 1790. *Mukherjee, N. R.*, und *Row, O.*: Studies of thin films by electron diffraction. J. appl. Phys. 22, 681—682 (1951).
 1791. *Sander, J. V.*, und *Tabor, D.*: Structure of thin films of aliphatic esters and alcohols on metals. Proc. Roy. Soc. A 204, 525 (1951).
 1792. *Schechter, A. B.*, *Jetscheistowa, A. J.*, und *Trejakow, I. I.*: Struktur von dünnen, aus Asbest und Gasruß aufgestäubten metallischen Schichten. Iswestija. Akad. Wiss. UdSSR 1951, 42—46.

1793. *Stauder, W. V., und Weber, A. H.*: Electron diffraction studies of etched Au leaf films. J. Franklin Inst. 251, 351—358 (1951).
1794. *Wilsdorf, H. G. F.*: Structure of amorphous Aluminium-Oxide films. Nature 168, 600 (1951).
1795. *Ells, C. E., und Scott, G. D.*: The structure of sputtered silver films. J. appl. Phys. 23, 31—34 (1952).
1796. *Feitknecht, W.*: Über den Zusammenbruch der Oxydfilme auf Metalloberflächen in sauren Dämpfen und den Mechanismus der atmosphärischen Korrosion. Chimia 6, 3—13 (1952).
1797. *van Iitterbeek, A., de Greve, L., und Heremans, F.*: Measurements on the formation of thin films. Appl. Sci. Res. B. 2, 352—360 (1952).
1798. *Takahashi, N.*: Über die Struktur von elektrolytisch auf einen elektrolytisch-polierten β -Messing-Einkristall niedergeschlagenen Kupferfilmen. C. R. Acad. Sci. Paris 234, 1619—1621 (1952).
1799. *Heidenreich, R. D., und Peck, V. G.*: Fine structure of metallic surfaces with the electron microscope. J. appl. Phys. 14, 23 (1943).
1800. *Barrett, C. S.*: Metallography with the electron microscope. Trans. Am. Inst. Mining Metal Eng. 156, 62—80 (1944).
1801. *Marton, L.*: Electron microscope study of ferromagnetic domains. Phys. Rev. 65, 353—354 (1944).
1802. *Quarrel, A. G.*: Electrons in the examination of metals. Sheet Metal Ind. 1718, Okt. 1944.
1803. *Ostroumow, B. A.*: Die Elektronenmikroskopie in der Metallurgie. Betriebslabor UdSSR 11, 554 (1945).
1804. *Anonym*: Electron microscope proves atomic nature of rust. Steel 118, 78—79 (1946).
1805. *Desch, C. H.*: State and properties of metallic surfaces. Nature 157, 271 (1946).
1806. *Dupouy, G.*: The electron microscope. Its use in metallography and in studying the conditions of surfaces. Metal Treatment 153 (1946).
1807. *Léauté, L.*: Les applications du microscope électronique à la métallographie. L'Optique Électronique, Éd. L. de Broglie, Éditions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale, Paris S. 209 (1946).
1808. *Sanderson, I.*: Microscope in metallurgy; studies at high and low temperatures. Chem. Age London 54, 612 bis 614 (1946).
1809. *Barret, C. S.*: The electron microscope and its application to metals. Electronic methods of inspection of metals. Am. Soc. Metals 107—150 (1947).
1810. *de Decker, H. C. J.*: The significance of the electron microscope for metal research. Metalen 1, 113—117 und 139 bis 151 (1947).
1811. *Geisler, A. H., und Keller, F.*: Study of age-hardening by the aid of the electron microscope. Engineer 183, 194 bis 195 (1947).
1812. *Ingelse, L.*: Methods and results of electron microscope research on metals. Metalen 1, 155—157; 181—188; 203 bis 206 (1947).
1813. *Kondrijski, E. I.*: Die Arbeit sowjetischer Wissenschaftler über Ferromagnetismus. Ergebnisse der phys. Wiss. UdSSR 22, 194—217 (1947).
1814. *Mehl, R. F., Ramberg, E. G., und Baker, R. F.*: First successful photograph of steel surface made with an electron microscope. Metal. Prof. 52, 988 (1947).
1815. *Dankow, P. D., und Schischakow, N. A.*: Elektronographische Untersuchung der Größe von Eisenkristallen und der Dicke von auf diesen gebildeten Oxydschichten. J. Phys. Chem. UdSSR 22, 956 (1948).
1816. *Delisle, L.*: A method of examination of sections of fine metal particles with the electron microscope. J. appl. Phys. 19, 1186 (1948).
1817. *Geisler, A. H., und Newkirk, J. B.*: Mechanism of precipitation in a permanent magnet alloy. Met. Tech., August 1948. Proc. Amer. Inst. Min. Met. Eng. Tech. Publ. No. 2444.
1818. *Mahla, E. M., und Nielsen, N. A.*: A study of films isolated from passive stainless steels. Trans. Electrochem. Soc. 93, 1—16 (1948).
1819. *Robillard, J.*: Le microscope électronique en métallurgie. J. Soc. Ing. Auto. 21, 213—222 (1948).
1820. *Geach, G. A.*: Metallurgical achievements of the electron microscope. Metallurgia 40, 319—326 (1949).
1821. *Gulbransen, E. A.*: Kinetic and structural factors involved in the oxidation of metals. Ind. Eng. Chem. 41, 1385 bis 1391 (1949).
1822. *Robillard, J.*: Le microscope électronique et ses applications en métallurgie. Microscopie 1, 65—117 (1949).

1823. *Robillard, J.*: Le microscope électronique et ses applications en métallurgie. II. Techniques de préparation des spécimens pour la métallographie au microscope électronique. *Microscopie* 1, 165—182 (1949).
1824. *Stern, G.*: Physical properties of reduced iron powder plus graphite and copper. *Iron Age* 163, 81—85 (1949).
1825. *Trillat, J. H.*: La radiographie électronique et ses applications en métallurgie. *Revue Métallurgie* No. 2, 79 (1949) Febr.
1826. *Anonym*: Die Anwendung des Elektronenmikroskops in der Metallkunde. *Metall* 4, Nr. 23—24, 510—512 (1950).
1827. *Burgers, W. G.*, und *Rathenau, G. W.*: Emission microscopy in metallurgical research. *Proc. Conf. Electron Microscopy Delft Juli 1949*, S. 81—83 (1950).
1828. *Coheur, P.*, und *Habraken, L.*: Creep of steel and electron microscope. *Proc. Conf. Electron Microscopy, Delft Juli 1949*, S. 172—174 (1950).
1829. *Courtet, R.*: Étude, par diffraction électronique, de certaines réactions et structures superficielles dans le cas des métaux. Thèse Paris 1950 — Métaux & Corrosion 297, Mai 1950, 298, Juni 1950, 299, Juli-August 1950.
1830. *Crafts, W.*, und *Lamont, J. L.*: Carbides in long-tempered vanadium steels. *J. Metals* 188, 561—574 (1950).
1831. *Grube, W. L.*: Electron metallography of cemented carbides. *Metal Progress* 57, 341—345 (1950).
1832. *Guljajew, A. P.*, *Sauraschin, A. G.*, und *Strelnikow, I. A.*: Anwendung starker Vergrößerungen bei der Untersuchung des Stahlgefüges. *Betriebslabor UdSSR* 16, 1335—1336 (1950).
1833. *Hunger, J.*, und *Pawlek, F.*: Die Anwendung des Elektronenmikroskops in der Metallkunde. *Metall* 4, 510 (1950).
1834. *Kruschtschew, M. M.*, und *Berkowitsch, E. S.*: Ein Versuch zur Anwendung des Elektronenmikroskops bei der Ausmessung sehr kleiner Eindrücke in der Mikrohärtprüfung. *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, Abt. techn. Wiss.* No. 11, 1645—1647 (1950).
1835. *Mahla, E. M.*, und *Nielsen, N. A.*: Carbide precipitation in type 304 stainless steel — an electron microscope study. *Amer. Soc. Metals Reprint* No. 16, 25 (1950).
1836. *Rowe, E. H.*: Uranium as a metallography aid. *Metal Progress* 57, 336 (1950).
1837. *Schraiber, D. S.*, *Moltschanowa, J. K.*, und *Schtscherbakowa, N. S.*: Methodik der Gefügeuntersuchung von Metallen mit Hilfe des Elektronenmikroskops. *Betriebslabor. UdSSR* 16, 1321—1330 (1950).
1838. *Schwartz, C. M.*: The progress of electron microscopy of metals in America. (Excluding the light metals.) *Metall. Application of the Electron Microscope 1950*, 125—138.
1839. *Ssadowski, W. D.*, *Lerinman, R. M.*, und *Poljakowa, A. M.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Austenit zerfalls in der perlitisch-troostitischen Stufe. *Dokl. Akad. Wiss. UdSSR* 71, 299 (1950).
1840. *Teague, D. M.*, und *Zimmermann, L. H.*: A technique for studying the electron microstructure of steel. *J. appl. Phys.* 21, 72 (1950).
1841. *Brunt, J. J.*, und *Downer, A. N.*: An examination of weld metal by means of electron microscope. *Nature* 167, 646 (1951).
1842. *Coheur, P.*, und *Habraken, L.*: Untersuchung von Tieftemperatur-Bainit unter dem Elektronenmikroskop. *Rev. univ. Mines, Métallurg. Trav. publ. Sci. Arts appl. Ind.* (9) 7 (94), 107—111 (1951).
1843. *F. C. T.*: The electron microscope in metallurgy. *Nature* 168, 179 (1951).
1844. *Feng, I-Ming*: Applications of polystyrene particles in conjunction with shadow casting to the study of polished metallic surfaces. *J. Appl. Phys.* 22, 820—824 (1951).
1845. *Kalmus, E. H.*: Report on the annual meeting of the Electron Microscope Society of America. *Mikroskopie* 6, 123—124 (1951).
1846. *Koch, L.*: Die Anwendung der Elektronenmikroskopie zum Studium metallkundlicher Probleme. *Siemens-Entwicklungsgeschichte* 14, 366—377 (1951).
1847. *Lerinman, R. M.*, *Ssadowski, W. D.*, und *Poljakow, A. M.*: Untersuchungen der Struktur von gehärtetem und angelassenem Stahl im Elektronenmikroskop. *Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie* 15, 387—392 (1951).
1848. *Radavich, J.*, und *Wert, Ch.*: Study of precipitates of C and N in iron with an electron microscope. *J. appl. Phys.* 22, 367—371 (1951).
1849. *Schraiber, D. S.*: Anwendung des Elektronenmikroskops zur Untersuchung der Metallstruktur. *Iswestija Akad.*

- Wiss. UdSSR, physik. Serie 15, 355 bis 357 (1951).
1850. *Yearian, H. J.*: Formation of oxide films on chromium steels. Phys. Rev. 82, 341 (1951) und Bull. Amer. physic. Soc. 25, 54 (1951).
 1851. *Burwell, J. T.*, und *Strang, C. D.*: On the empirical law of adhesive wear. J. appl. Phys. 23, 18—28 (1952).
 1852. *Dalitz, V. Ch.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Metalloberflächen. Metalen 7, No. 9, 3—11 (1952).
 1853. *Heidenreich, R. D.*, und *Nesbitt, E. A.*: Physical structure and magnetic anisotropy of Alnico 5, Part I. J. appl. Phys. 23, 352—365 (1952) (s. 1859).
 1854. *Hyam, E. D.*, und *Nutting, J.*: A method for the electron and optical microscopic examination of identical areas. Brit. J. appl. Phys. 3, 173—176 (1952).
 1855. *Koch, W.*: Mikroanalytische Aufgaben in Metallkunde und Metallurgie. Angewandte Chemie 64, 187—195 (1952).
 1856. *König, H.*: Ist eine Gamma-Phase des Eisens in aufgedampften Schichten nachweisbar? Zeitschr. f. Metallkunde 43, 26—28 (1952).
 1857. *Mahl, H.*: Das Elektronenmikroskop in der Metallkunde. Metall 6, 69—73 (1952).
 1858. *Menter, J. W.*, *Nutting, J.*, und *Tsou, A. L.*: Austenite in low carbon iron. Proc. Phys. Soc. (London) B 65 305 bis 306 (1952).
 1859. *Nesbitt, E. A.*, und *Heidenreich, R. D.*: Physical structure and magnetic anisotropy of Alnico 5. Part II. J. appl. Phys. 23, 366—371 (1952) (s. 1853).
 1860. *Raether, H.*: Über die Struktur einer Metalloberfläche. (Nach neueren Untersuchungen mittels Elektronenstrahlen.) Metalloberfläche 6 (A), 113 119 (1952).
 1861. *Schrader, A.*: Zusammenhang zwischen Ätzen von Stahlschliffen, Lackabdruck und übermikroskopischem Bild. Z. f. wiss. Mikroskop. und mikroskop. Techn. 60, 309—316 (1952).
 1862. *Verma, A. R.*: Growth spirals on Haematite (Fe_2O_3) crystals. Nature 169, 540 (1952).
 1863. *Yamaguchi, S.*: Elektronenmikroskopie für den Metalleinkristall. Naturwiss. 39, 19 (1952).
 1865. *Buchan, G.*: Physical examination of brass deposits. Trans. Inst. Rubes Ind. 20, 205 (1945).
 1866. *Keller F.*, und *Ewards, J. D.*: Performance and structure of anodic coatings on aluminium. Iron Age 156, 75 (1945).
 1867. *Clark, T. P.*, und *Vierthaler, W. A.*: An electron microscope study of used nitrided pistons. Nat. Adv. Comm. Aeronaut. Tech., Note 1132 (1946).
 1868. *Geisler, A. H.*, und *Keller, F.*: Precipitation in age hardeness aluminium alloys. Met. Tech. Amer. Inst. Min. Met. Eng., Tech. Publ. No. 2444 (1946) Okt.
 1869. *Schofield, T. H.*, und *Cuckow, F. W.*: The microstructure of wrought non-arsenical phosphorus desoxidised copper, contained small quantities of bismuth. J. Inst. Metals 72, 377 (1947).
 1870. *Chalmers, B.*, *King, R.*, und *Shuttleworth, R.*: Thermal etching of silver. Proc. Roy. Soc. A, 193, 465 (1948).
 1871. *Maddin, R.*, *Mathewson, C. H.*, und *Hibbard, W. R. Jr.*: Unpredicted cross-slip in single crystals of alpha-brass. Met. Tech. Proc. Amer. Inst. Min. Met. Eng., Tech. Publ. No. 2331 (1948) Febr.
 1872. *Shuttleworth, R.*: Thermal etching of silver. Metallurgia 38, 125 (1948).
 1873. *Castaing, R.*, und *Guinier, A.*: Sur les images au microscope électronique des alliages aluminium-cuivre durcis. C. R. Acad. Sci. 228, 2033—2035 (1949).
 1874. *Guinier, A.*: Age hardening of light alloys. Research 2, 6 (1949).
 1875. *Habraken, L.*: Application de la microscopie électronique à l'étude des aciers Cr-Mo résistant à chaud. C. R. Recherches-Verslagen over Navorsingen Nr. 1, 55—70 (1949).
 1876. *Saulneir, A.*: Le microscope électronique et son application à la métallurgie. Rev. Alum. 26, 355—360 (1949).
 1877. *Bailey, G. L. J.*, und *Vernon-Smith, Sh.*: The structure of some nonferrous alloys as revealed by the electron microscope. Inst. Metals Monograph No. 8, 43—55 (1950).
 1878. *Buinow, N. N.*, und *Lerinman, R. M.*: Eine sich bei der Alterung von Aluminium bildende Feinstruktur. Doklady Akad. Wiss. UdSSR 74, 929—931 (1950).
 1879. *Castaing, R.*: Recherches au microscope électronique sur les premiers stades du durcissement d'alliage aluminium-

H7. Metallographische Objekte: Nicht-eisen-Metalle

1864. *Anonymous*: Electron microscope investigation of smooth aluminium surfaces. Aluminium 23, 304 (1941).

- cuivre. Proc. Conf. Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 175—178 (1950).
1880. *Keller, F.*: Electron microscopy of light-metal alloys. Inst. Metals Monograph No. 8, 85—96 (1950).
1881. *Weil, R.*, und *Read, H. J.*: Electron-microradiography of electrodeposited metals. J. appl. Phys. 21, 1068 (1950).
1882. *Brown, A. F.*, und *Honeycombe, R. W. K.*: Micro-slip in metal crystals. Philosophical Magazine 42, 1146 (1951).
1883. *Brown, A. F.*: Slip bands and hardening processes in aluminium. J. Inst. of Metals 80, 115—124 (1951/52).
1884. *Buinow, N. N.*, und *Lerinman, R. M.*: Submikroskopische Struktur der Al₂Ni-Legierung. Dokl. Akad. Wiss. UdSSR 79, 69—72 (1951).
1885. *Buinow, N. N.*, und *Lerinman, R. M.*: Untersuchung der Anfangsstadien der Alterung in Legierungen auf Aluminium-Basis. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie 15, 358—365 (1951).
1886. *Czyzewski, H.*: Branching of slip lines in alpha-brass. J. appl. Phys. 22, 846 (1951).
1887. *Finch, G. L.*, und *Layton, D. N.*: The crystal structure of metallic electrodeposits. J. electrodepos. techn. soc. 27, 12 (1951).
1888. *Halfawy, M.*: On the theory of electrolytic polishing. Experientia 7, 175 bis 176 (1951).
1889. *Heidenreich, R. D.*: Electron transmission through thin metal sections with application to self-recovery in cold worked Aluminium. The Bell System Technical Journal 30, 907 bis 932 (1951).
1890. *Jakutowitsch, M. W.*, *Jakowlewa, E. S.*, *Lerinman, R. M.*, und *Buinow, N. N.*: Untersuchung deformierter Aluminium-Kristalle im Elektronenmikroskop. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie 15, 383—386 (1951).
1891. *Milligan, W. O.*, und *Weisner, H. B.*: Orientation effects in transparent alumine films. J. Physic. Colloid Chemistry 55, 490—496 (1951).
1892. *Mitschurina, K. A.*, *Prileshajewa, I. N.*, und *Spiwak, G. W.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Strukturänderungen von Aluminium bei der Elektroerosion. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, phys. Serie 15, 418 bis 423 (1951).
1893. *Nishimura, H.*, *Murakami, Y.*, und *Takamura, J.*: On the sub-structure of metallic crystals. Technical Reports of the Engineering Research Inst. Kyoto University 1, 19—27 (1951).
1894. *Nishimura, H.*, und *Takamura, J.*: Effect of strain rate in the plastic deformation in Aluminium single crystals. Memoirs of the Faculty of Engineering, Kyoto University 13, 1—20 (1951).
1895. *Palatnik, L. S.*: Umwandlungen in der Oberflächenschicht eines Metalls unter der Einwirkung elektrischer Entladungen. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie 15, 467—471 (1951).
1896. *Read, J. H.*, und *Weil, R.*: Korngröße und Härte von Nickelniederschlägen in Beziehung zum Glanz. Metalloberfläche Ausg. A 5, 97—101 (1951).
1897. *Schemajew, A. M.*, *Frimer, A. I.*, und *Ssilwestrowitsch, I. I.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von der Einwirkung von Glimmentladungen ausgesetzten Elektrodenoberflächen. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie 15, 413—417 (1951).
1898. *Spiwak, G. W.*, und *Lukatzkaja, R. A.*: Elektronenmikroskopie geringer Vergrößerung bei Gegenwart von Gasen bei Atmosphären- und erniedrigtem Druck. Iswestija Akad. Wiss. UdSSR, physik. Serie 15 434—443 (1951).
1899. *Takahashi, N.*, und *Asaeda, T.*: Studies on mechanically finished metallic surfaces by electron diffraction and electron microscopy. I. Lapping. J. Sci. Res. Inst. 45, 23—137 (1951); Treatise No. 1240, 23—30.
1900. *Yamaguchi, Sh.*: On the etched surfaces of Nickel single crystals revealed by means of electron diffraction and microscopy. Bull. Chemical Soc. Japan 24, 122—124 (1951).
1901. *Yamaguchi, Sh.*: Oriented crystals in the rolled plates of alloys. J. appl. Phys. 22, 680—681 (1951).
1902. *Davis, R. J.*, *Pearce, R.*, und *Hume-Rothery, W.*: The structure of an α/β brass. Acta Crystallographica 5, 36 bis 38 (1952).
1903. *Hejtele, H.*: Beitrag zur Kurzprüfung galvanischer Chrom-Nickel-Überzüge auf Korrosionsbeständigkeit. Metalloberfläche Ausgabe B, 4, 17—24 (1952).
1904. *Mühlberger, H.*: Aus der Praxis des anodischen Polierens von Messing und Kupfer. Metallkunde 43, 142—146 (1952).
1905. *Trotter, J.*: Electron-microscopic studies of slip in aluminium during creep. J. Inst. of Metals 1, 521—523 (1952).

1906. *Yamaguchi, S. H.*: On the etched surfaces of nickel single crystals. J. appl. Phys. 22, 983—984 (1951).
1907. *Yamaguchi, Sh.*: A note on „Electron microradiography of electrodeposited metals“. J. appl. Phys. 23, 288—289, (1952).

H 8. Oberflächen technischer Körper

1908. *Chaudron, G.*: Surface study meeting. Rev. met. 42, 305 (1945).
1909. *Dupouy, G.*: The electron microscope and its use in the study of surfaces. J. des États de Surface 15. Okt. 1845.
1910. *Harkins, W. D.*: Surfaces of solids in science and industry. I. and II. Science 102, 263 und 292 (1945).
1911. *Heidenreich, R. D.*: Electron microscope investigation of surface structure. S.A.E. Journal 53, 588—594 (1945).
1912. *Dohmalek, R., und Vessely, S.*: Die Elektronenmikroskopie von Oberflächen (tschechisch) Strojnický Obzor. 29, No. 12, 1—5 (1950).
1913. *McCartney, J. T., und Anderson, R. B.*: Electron microscopic replica studies of porosity in fused iron catalysts. J. appl. Phys. 22, 1441—1443 (1951).
1914. *Helwig, G.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung scharfer Schneiden. Z. wiss. Mikroskop. Techn. 60, 422—424 (1952).

H 9. Sonstiges, z. B. photographische Schichten, technische Emulsionen, Farben usw.

1915. *Schechter, A. B., Roginski, S. Z., und Sacharowa, S. W.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Katalysatoren. Acta Physiochim. UdSSR 20, 217 (1945).
1916. *Sneddon, R.*: Petroleum research goes electronic. Petroleum Eng. 17 59—60 (1945).
1917. *Staley, F. R.*: Electronics, its application to petroleum technology. Oil Gas J. 44, 127—128 (1945).
1918. *Turkevich, J.*: Electron microscopy of catalysts. J. Chem. Phys. 13, 235 (1945).
1919. *Riley, H. L.*: Reactions in the solid phase. J. Oil and Colour Chem. Assoc. 29, 25 (1946).

1920. *Farrington, B. B., und Birdsall, D. H.*: Study of lubrication greases by electron microscope. Oil Gas J., 45, 268 (1947).
1921. *Farrington, B. B., und Birdsall, D. H.*: An electron microscope study of lubricating greases. Inst. Spokesman 11, 4—10 (1947).
1922. *Norris, F. A., und Mattil, K. F.*: A new approach to the glycerid structure of natural fats. J. Am. Oil Chem. Soc. 24, 274—275 (1947).
1923. *Schoenholz, D., und Kimball, C. S.*: Electron microscope studies: bright-drying wax dispersions. Soap and Sanit. Chem. 23, 131 (1947).
1924. *Anonym*: Electron microscopic studies; aid to I. C. paint research. Chem. Age, London 59, 592 (1948).
1925. *de Berard, W. W., und Baylis, J. R.*: New vistas to water quality research. Eng. News 140, 639—642 (1948).
1926. *Ellis, S. G.*: Oil industry uses for electron microscope II. Petroleum Refine 27, 487—491 (1948).
1927. *Berry, Ch. R., und Griffith, R. L.*: Structure and growth mechanism of photolytic silver in silver bromide. Acta Crystallographica 3, 219—222 (1950).
1928. *Reis, T.*: Research in the oil industry. Proc. Conf. Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 179—182 (1950).
1929. *Ammann-Brass, H.*: Elektronenmikroskopische Untersuchung der physikalischen Reifung von chloresilberarmen photographischen Emulsionen. Z. f. Naturforschg. 6a, 372—374 (1951).
1930. *Dalle Nogare, G.*: Un metodo de preparazione di provini di pigmenti per microscopia elettronica. La Chimica e l'Industria 33, 546—548 (1951).
1931. *Moore, A. C.*: The effect of pressure and friction on photographic emulsions. British J. appl. Phys. 2, 21—25 (1951).
1932. *Kahler, H., und Lloyd, B. J.*: Sedimentation von Polystyrolmilch in einer Kipprohrzentrifuge. J. Phys. Coll. Chem. 55, 1344—1350 (1951).
1933. *Okada, S., Kawane, M., und Magari, S.*: The observation of the precipitation process by electron microscope. I. Barium sulfate. Mem. Fac. Engr. Kyoto Univ. 13, 198—208 (1951).
1934. *Rochow, E. G., und Rochow, T. G.*: The properties and molecular weights of

- some silicone polymers. J. Phys. Coll. Chem. 55, 9—16 (1951).
1935. *Trillat, J. J.*: Sur la transformation du bromure d'argent en argent. C.R. Acad. Sci. Paris 233, 1188—1189 (1951).
1936. *Bradford, E. B.*: Electron microscope study of plasticized latices. J. appl. Phys. 23, 609—612 (1952).
1937. *Meurer, S.*: Licht- und elektronenmikroskopische Studien an gebrauchten Motorenölen. Z. Vereins Deutscher Ingenieure 94, 160 (1952).

I. Ergebnisse aus der Textilfaser- und Kunststoff-Forschung

I 1. Allgemeines und Übersichten

1938. *Drummond, D. G.*: Applications of electron micrography in textile research. Phot. J. 85 B, 4 (1945).
1939. *Schiefer, H. F.*: Solution of problem of producing uniform abraision and its application to the testing of textiles. J. Research Nat. Bur. Standards 39, 1 (1947).
1940. *Anonym*: Electron microscope increased usefulness in textiles. Textile World 98, 123 (1948).
1941. *Dawson, I. M., und Vand, V.*: The observation of spiral growth-steps in n-paraffin single crystals in the electron microscope. Proc. Royal Society A, 206, 555—562 (1951).
1942. *Dawson, I. M., und Vand, V.*: Observation of spiral growth-steps in n-paraffin single crystals in the electron microscope. Nature 167, 476 (1951).
1943. *Mahl, H.*: Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung an Textilfasern. Z. wiss. Mikroskop. mikrosk. Techn. 60, 373—380 (1952).
1949. *Hock, C. W.*: Structure of cellulose fibres as revealed by the electron microscope. J. appl. Phys. 19, 118 (1948).
1950. *Widerkehr, L.*: Disclosures (made by use) of the microscope. Bull. assoc. techn. ind. papetière 2, 35 (1948).
1951. *Siegel, B. M.*: The structure of cellulose in the electron microscope. TAPPI 32, 109—116 (1949).
1952. *Ames, J., und Sampson-Stevenston, A. M. D.*: Eine elektronenmikroskopische Studie an weichgemachter Nitrozellulose. J. appl. Phys. 1, 337 bis 340 (1951).
1953. *Frey-Wyssling, A.*: Über den inneren Aufbau der Zellulosemikrofibrillen. Makromol. Chem. 6, 7—14 (1951).
1954. *Frey-Wyssling, A.*: Elektronenmikroskopie gelöster und gefällter Zellulose. Die Makromolekulare Chemie 7, 163 bis 167 (1951).
1955. *Frey-Wyssling, A., und Mühlethaler, K.*: The fine structure of cellulose. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 7, 1—27 (1951).
1956. *Frey-Wyssling, A., und Stecher, H.*: Das Flächenwachstum der pflanzlichen Zellwände. Experientia 7, 420 (1951).
1957. *Kling, W., und Mahl, H.*: Zur Morphologie der Baumwollfaser I.: Die Primärwand und ihr Verhalten beim alkalischen Abkochen. Melliand Textilberichte 32, 131—136 (1951).
1958. *Meyer, K. H., Huber, L., und Kellenberger, E.*: La texture de la cellulose animale. Experientia 7, 216—218 (1951).
1959. *Rånby, B. G.*: 3. Fibrous macromolecular systems; cellulose and muscle; the colloidal properties of cellulose micells. Discussions of the Faraday Society No. 11, 158—164 (1951).
1960. *Roelofsen, P. A.*: Orientation of cellulose fibrils in the cell wall of growing cotton hairs and its bearing on the physiology of cell wall growth. Biochim. et Biophys. Acta 7, 43—53 (1951).

I 2. Natürliche Zellulose-Fasern und Papier

1944. *Spurlin, H. U., und Mitarb.*: Characterization of cellulose derivatives by solution properties: plasticisers as solvents. J. Polymer. Sci. 1, 63 (1946).
1945. *Swinton, K. R.*: Use of radio and electronics in the pulp and paper industry. Pulp and Paper Mag. Can. 47, 184 bis 187 (1946).
1946. *Utschastkina, S. W.*: Das Elektronenmikroskop in der Papierindustrie. Papierindustrie UdSSR 21, 38—39 (1946).
1947. *Renaud, R.*: Electron microscope studies of linters pulp beaten to varying degrees Schopper-Riegler. Bull. assoc. tech. ind. papetière 1, 99 (1947).
1948. *Rollins, M. L.*: Cotton fibres: swelling measurement by microscopical methods. Textile Research J. 17, 19—26 (1947).

1961. *Kling, W., und Mahl, H.*: Zur Morphologie der Baumwolle II: Über den bakteriellen Abbau der Baumwollfaser und die Bauelemente der Sekundärwand. *Melliand Textilberichte Heidelberg* 33, 32—36 (1952).
1962. *Kling, W., und Mahl, H.*: Zur Morphologie der Baumwollfaser III: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Faserquerschnitten. *Melliand Textilberichte, Heidelberg* 33, 328—331 (1952.)

I 3. Wolle, Seide und Leder

1963. *Mercer, E. H., und Rees, A. L. G.*: Structure of the cuticle of wool. *Nature* 157, 589 (1946).
1964. *Olofsson, B.*: Investigation of wool by electron microscope. *Medd. Svenska Textilforskningsinst., Göteborg* 3, 1946.
1965. *Millson, H. E., Watkins, H. W., und Roger, G. L.*: Studies on wool dyeing crocking. *Am. Dyestuff Reptr.* 36, 45 bis 63; 69 bis 70 (1947).
1966. *Anonym*: Electron microscopy of wool. *Textile Industries* Dez. 1948.
1967. *Gorter, Chr., J. und Houwink, A. L.*: An electron microscope study of the structure of the wool hair. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch.* 51, 262—268 (1948).
1968. *Anonym*: The fine structure of the wool fibre as revealed by the electron microscope. *Wool. Sci. Rev.* 22, 3—14 (1949).
1969. *Lindberg, J., Mercer, E. H., Philip, B., und Gralén, N.*: The fine histology of the keratin fibres. *Textile Res. J.* 19, 673—685 (1949).
1970. *Philip, B., und Lagermalm, G.*: A contribution to the knowledge of the surface structure of wool. *Proc. Conf. Electron Microscopy, Delft* Juli 1949, S. 166—169 (1950).
1971. *Makinson, K. R.*: Abdruckverfahren zur Elektronenmikroskopie der Oberfläche von Wollaschen. *Textile Res. J.* 20, 22—28 (1950).
1972. *Mercer, E. H., und Roadknight, L.*: The relation between damage and the structure of the wool fibre. *The Textile J. of Australia* 20. 7. 1950.
1973. *Mercer, E. H.*: Zur Existenz einer sogenannten Subcutis oder Zwischenmembran in Wolle und Haar. *Melliand Textilberichte, Heidelberg* 31, 694 bis 695 (1950).
1974. *Mercer, E. H., Lindberg, J., und Philip, B.*: Die „subcutis“ und andere kutikuläre Bestandteile von Wolle und Haaren. *Melliand Textilberichte Heidelberg* 31, 32—35 (1950).
1975. *Zahn, H.*: Sammelreferat über Histologie, Feinstruktur, Chemie und Technologie der Keratine. *Das Leder* 1, 222 bis 228 (1950).
1976. *Haselmann, H., und Zahn, H.*: Über den histologischen Aufbau der Schuppenschicht von tierischen Haaren. *Melliand Textilberichte Heidelberg* 32, 1—6, (1951).
1977. *Mercer, E. H.*: Formation of silk fibre by the silkworm. *Nature* 168, 792 (1951).
1978. *Peacock, N., Sikorski, S., und Woods, H. J.*: Crystalline structure of the cuticular sheath of wool fibres. *Nature* 167, 408 (1951).
1979. *Elliot, R. L., und Manogue, B.*: Eine elektronenmikroskopische Studie über die Oberflächenstruktur der Wolle. *J. Soc. Dyers Coll.* 68, 12—18 (1952).
1980. *Schuringa, G. J., Algera, L., Isings, J., und Ulée, A. J. Jr.*: Einige Bemerkungen über die Epikutikula der Wolle. *Experientia* 8, 57—58 (1952).

I 4. Synthetische Fasern

1981. *Hamm, F. A., und Corner, J. J.*: Replica studies of dyed nylon. *Anat. Chem.* 20, 861—870 (1948).
1982. *Hock, Ch. W.*: An electron-microscopical examination of Rayon. *Textile Research J.* 18, 366—371 (1948).
1983. *Watson, J. H. L., Léger, A. E., und Oulett, C.*: On the growth and properties of the cuprene fibre. *J. Phys. Coll. Chem.* 54, 969—979 (1950).
1984. *Happey, F.*: Fibre formation in synthetic polymers: methods and features. *Brit. J. appl. Phys.* 2, 117—126 (1951).
1985. *Hermans, P. H.*: Untersuchung über die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften bei Kunstseiden nach einer von E. Elöd angegebenen Methode. *Koll.-Z.* 122, 1—5 (1951).

I 5. Kautschuk, Gummi, Buna

1986. *Columbian Carbon Research Laboratory*: Electron microscope studies of rubber latices and pigments. 1944.
1987. *Anonym*: The electron microscope, its value to rubber manufacturers. *India Rubber J.* 3, 25. Aug. 1945.

1988. *Thirion, P.*: Relations entre les structures et l'élasticité des caoutchoucs. Rev. génér. Caoutch. I, 27, 267—273 (1950).
1989. *Schoon, Th.*: Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel für die neuzeitliche Kautschukforschung. Karet 2, 78—80 (1951).
1990. *Endter, F.*: Zum Aufbau des Systems Füllstoff/Kautschuk. Kautschuk und Gummi 5, 17—22 (1952).
1991. *Kruse, J.*: Über die gegenseitige Beeinflussung von Kautschuk und Füllstoff bei Deformation eines Vulkanisates. Kautschuk und Gummi 5, Nr. 1, WT 1—WT 3 (1952).

K. Ergebnisse aus Biologie und Medizin

Wird mit

Nr. 1992—2337

im 6. Heft des 61. Bandes fortgesetzt.

Die Naturwissenschaft in Lebensbildern großer Forscher

Von Prof. Dr. H. Falkenhagen

224 Seiten, Ganzleinen DM 10.—

Naturwissenschaftliche Rundschau: Das großangelegte, straffgegliederte und von der Warte der modernen Physik aus bearbeitete Werk will jedem Bildungsfreudigen das Wachstum der Naturerkenntnisse und ihrer Anwendungen — von 600 v. Chr. bis zur Gegenwart — an den Lebens- und Leistungsbildern von 108 Forscherpersönlichkeiten gleichsam verlebendigen. Der gelehrte Verfasser hat es verstanden, sowohl das gewaltige Erkenntnisgut in lapidarer Kürze zu meistern, als auch in beschwingter Sprache und liebevollem Eingehen die rein menschlichen Seiten der Forscher zu schildern.

P. Walden, Tübingen.

S. HIRZEL VERLAG
STUTTGART

GURR'S



Gegründet 1915

STANDARD FARBEN UND REAGENZIEN FÜR DIE MIKROSKOPIE BEKANNT und VERWENDET in der GANZEN WELT

Verlangen Sie den Katalog A 34

Nun lieferbar

BIOLOGICAL STAINING METHODS

5. Ausgabe, beträchtlich erweitert, das vollkommenste Handbuch seiner Art. Farbig illustriert. DM 4.—

Portofrei!

GEORGE T. GURR LTD.
136 NEW KINGS ROAD
LONDON, S.W. 6

OPTIK

Von Prof. Dr. Hans Falkenhagen

VIII, 188 Seiten mit 43 Abbildungen. 8°. 1949

Halbleinen DM 9.—

Optik, Bd. 7 (1950) Heft 1: In kurzer und konzentrierter, aber doch leicht zugänglicher, keine besonderen Vorkenntnisse erfordernder Darstellung entwickelt der Verfasser die theoretische Optik. Auch die Lorentzsche klassische Elektronentheorie wird dabei mit behandelt; die Optik und die Elektrodynamik bewegter Medien gibt Gelegenheit, auch die Grundlagen der speziellen Relativitätstheorie darzustellen. Die übersichtliche Darstellung, die auf engem Raum vieles bringt, wird dem Buche gewiß Freunde erwerben.

P. Jordan

S. HIRZEL VERLAG STUTTGART

ERNST KÜSTER †

Als nach leichter und kurzer Erkrankung am späten Nachmittag des 6. Juli 1953, wenige Tage nach der Vollendung des 79. Altersjahres, *Ernst Küster's* Herz für immer aufhörte zu schlagen, fand ein Leben voll unablässiger Arbeit sein Ende, das in humanistischer Haltung und strenger Selbstzucht allem Guten und Schönen gewidmet war.

Nur eine umfangreiche Würdigung von *Küster's* Wirken könnte den Leistungen des bedeutenden Botanikers, des höchst erfolgreichen akademischen Lehrers, des glänzenden Redners und fruchtbaren Schriftstellers gerecht werden und nicht zuletzt auch dem vortrefflichen Menschen, der im Kreise seiner Schüler und Kollegen und an seiner Gießener Hochschule einen Mittelpunkt geistiger Anregung darstellte, dessen Verlust noch lange zu verspüren sein wird.

An dieser Stelle soll nur der wichtigsten Ereignisse im Ablauf von *Ernst Küster's* Leben gedacht werden und insbesondere seiner Tätigkeit als Herausgeber der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, die er fast 50 Jahre lang mit nie erlahmender Sorgfalt betreut hat.

Geboren in Breslau am 28. Juni 1874 studierte *Ernst Küster* seit 1893 an den Universitäten Breslau, Berlin und München Naturwissenschaften, vor allem Botanik, erwarb aber auch umfassende Kenntnisse in den alten Sprachen, der Archäologie und der Kunstgeschichte. In München erhielt er 1896 den Grad eines Doktor phil. auf Grund einer botanischen Arbeit unter Leitung von *L. Radlkofer*. Von seinen Lehrern verdankt er die stärksten Antriebe *K. von Goebel* in München, und in Halle *E. Klebs*. Bei diesem habilitierte sich der 26jährige im Jahre 1900 für Botanik. Neun Jahre später erreichte ihn der Ruf als a. o. Professor nach Kiel, 1911 nach Bonn (Pharmakognosie), wo er 1918 zum persönlichen Ordinarius ernannt wurde. Und seit 1920 hatte er den Lehrstuhl der Botanik an der Universität Gießen inne, der er treu blieb. Aus älterer Zeit seien seine Untersuchungen zur Pflanzenpathologie und Cecidologie hervorgehoben. In den Gießener Jahren wandte er sich mehr und mehr der Erforschung der pflanzlichen Cytomorphologie zu. Hier war sein Ziel, wie er selber einmal aussprach, „das Sichtbare zu beschreiben und das Unsichtbare sichtbar zu machen“. Sein Lehrbuch „Die Pflanzenzelle“ bereitete er noch in den letzten Wochen für die dritte Auflage vor.

Der Krieg brachte *Küster* den Verlust seines Institutes und seiner Bibliothek, die Vernichtung von Manuskripten und des größten Teiles seiner Kunstsammlungen. All' dies und auch den Untergang der Universität Gießen, die als einzige in Westdeutschland das Schicksal erlitt, nicht vollständig wieder eröffnet zu werden, ertrug er mit stoischem Gleichmut. In der Zeit, da er keinen Raum als Laboratorium zur Verfügung hatte, schrieb er Lebenserinnerungen nieder. Sobald er aber eine kümmerliche Holzbaracke als „Institut“ beziehen konnte, nahm er ungebeugt Forschung und praktischen Unterricht wieder auf, getragen von der Verehrung seiner Schüler und Schülerinnen, deren blühende Jugend sein Alter mit heiterem Glanz umgab. 1947 fand auch das Botanische Institut in einem ehemaligen Seminarhaus der Universität eine erträgliche Unterkunft und hier arbeitete er auch nach seiner Emeritierung weiter bis zu seinem Ende.

Als *E. Küster* 1904 die Herausgabe der von *W. J. Behrens* begründeten Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie übernahm, stand er an der Schwelle des Mannesalters. 41 Bände tragen seinen Namen auf dem Titelblatt. Viele seiner Entdeckungen veröffentlichte *Küster* in ihren Spalten und in die Tausende gehen seine stets von Wohlwollen gelenkten Referate. Scherzhaft bezeichnete er sich selbst einmal gegenüber dem Schreiber als „den liebenswürdigsten Redakteur in Mitteleuropa“. Sein Verhältnis zu den alten Mitherausgebern, *R. E. Liesegang* und dem Unterzeichneten, war freundschaftlich. Kaum jemals wurden wissenschaftliche Fehden in den Veröffentlichungen ausgefochten. Die Wiedereröffnung der Zeitschrift nach dem Kriege betrieb *Küster* mit Eifer. So wird sein Name mit der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie für immer verbunden bleiben.

Alle, die *Ernst Küster's* vortreffliche Gesundheit kannten, erschütterte die Nachricht von seinem Tode wie ein jäher Schlag. Unerwartet wurde er seiner treuen Lebensgefährtin, Dr. *Gertrud Küster* geborenen *Winkelman*, seinen drei Kindern entrissen, seinen Freunden, seinen Kollegen, seinen Schülern, seiner Hochschule. Der akademischen Jugend aber mag er leuchtendes Vorbild eines deutschen Gelehrten sein, der sein Leben der Wissenschaft weihte. Für ihn gelten die Worte, die in Stein gemeißelt über der Pforte eines Gießener Institutes zu lesen waren:

Investigando vitam vitam consumimus.

W. J. SCHMIDT

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel (Vorsteher: Prof. Dr. E. LUDWIG)

Zur Frage der Spezifität des histologischen Glykogen- nachweises durch Silbermethoden

Von **Kurt S. Ludwig**

Mit 8 Abbildungen

Herrn Prof. Dr. B. Romeis zum 65. Geburtstag gewidmet

Einleitung

In neueren Arbeiten werden oft zwei Silbermethoden zum histochemischen Glykogenachweis verwendet, die der BAUERSchen Polysaccharidreaktion an Schärfe und mengenmäßiger Erfassung des Glykogens überlegen sein sollen.

MITCHELL und WISLOCKI veröffentlichten 1944 eine erste Silbermethode zur Glykogendarstellung. Dabei handelt es sich um eine leicht modifizierte PAPSche Bindegewebsversilberung, die außer den Gitterfasern auch das Glykogen als rundliche scharf begrenzte schwarze Silberkörnchen zur Darstellung bringen soll. MITCHELL und WISLOCKI kamen auf Grund von Serienschnitten, die alternierend einesteils nach ihrer Methode, andernteils nach BEST oder BAUER gefärbt waren, zur Überzeugung, daß die intrazellulären Silberkörnchen wirklich durch Glykogen bedingt seien. Zur Kontrolle benützten sie die Speichelprobe, ohne nähere Angaben über die von ihnen angewandte Technik zu machen.

PRITCHARD beschrieb 1949 eine zweite histochemische Silbermethode zur Glykogendarstellung. Seine Methode beruht auf zwei Tatsachen: 1. auf der Beobachtung von BAUER (1933), daß Glykogen nach Behandlung mit Chromsäure in Wasser unlöslich wird und Aldehydreaktionen zeigt, also reduzierend wirkt, und 2. auf der Beobachtung von MITCHELL und WISLOCKI (1944), daß unter gewissen Bedingungen Glykogen in histologischen Präparat ammoniakalische Silberlösung reduziert. PRITCHARD behandelt daher alkoholfixierte histologische Präparate mit Chromsäure und schließt eine leicht modifizierte FOOTSche Bindegewebsversilberung an. Er will festgestellt haben, daß nach dieser Behandlung die Abbauprodukte des vorhandenen Glykogens ammoniakalische Silberlösung spezifisch reduzieren. Zur Kontrolle benützt auch dieser Autor, neben Schnitten, die nach BEST und BAUER gefärbt worden waren, vor der Chromierung die Speichelprobe und zwar in einer ganz bestimmten Gestalt, von der noch die Rede sein soll.

Eigenartig scheint uns, daß bei diesen beiden Versilberungsmethoden sich nur am Glykogen oder dessen Abbauprodukten Silberkeime bilden sollen, die durch die anschließende Reduktion mit Formol (MITCHELL und WISLOCKI 1944) oder WILDERS Formol-Uranium-Reduktionsgemisch (PRITCHARD 1949) zu mikroskopischer Größe heranwachsen. Daß argyrophile Fasern durch die beiden Methoden versilbert werden,

ist zu erwarten und tatsächlich wenigstens gelegentlich auch der Fall, nicht nur nach dem Verfahren von MITCHELL und WISLOCKI (vgl. Abb. 5, 6), was PRITCHARD (1949) kritisierte, sondern, wenigstens in unseren Händen, auch nach demjenigen von PRITCHARD selbst, der das selbst nicht beobachtet hat. Unsere Präparate zeigen alle mäßig schön die argyrophilen Fasern (vgl. Abb. 3, 7).

Die Tatsache, daß heute so viele Silbermethoden für fibrilläre Strukturen und für Zellbestandteile der verschiedensten Art existieren (ROMEIS 1948), weckt schon Bedenken gegenüber der histochemischen Spezifität irgend einer von ihnen, besonders wenn die im Gewebe vorhandenen Silberkeime anschließend entwickelt werden. Anders verhält es sich beim histochemischen Nachweis des Vitamin C nach GIROUX und LEBLOND (1934), bei dem keine nachträgliche Entwicklung erfolgt, sondern das Vitamin C selbst die saure Silbernitratlösung zu metallischem Silber reduziert (vgl. WOLF-HEIDEGGER und WALDMANN 1942). Mit Sicherheit kennen wir in den Geweben erst einige wenige chemische Gruppen, an denen Silberkeime entstehen, im übrigen sind wir auf mehr oder weniger überzeugende Hypothesen angewiesen (LIPP 1951, 1952). Dazu kommt, daß alle uns bekannten Silberimprägnationsmethoden sehr launisch sind, d. h. verschiedene Bilder ergeben, auch wenn die Präparate gleichzeitig und gleichlang in denselben Lösungen gehalten werden.

Aus diesen Überlegungen heraus zweifelten wir an der Spezifität der Silbermethoden für den Glykogennachweis und stellten uns die Aufgabe, dieselbe nachzuprüfen.

Material und Technik

Als Testobjekt wählten wir die Lebern zweier ausgewachsener weißer Mäuse. Die Tiere wurden morgens um 08.00 Uhr mit Chloroform getötet, die Bauchhöhle sofort nach erfolgtem Tod eröffnet und Stückchen aus jeder Leber in den folgenden Lösungen fixiert: 1. absoluter Alkohol bei 0°C während 24 Stunden (PRITCHARD 1949); 2. in absolutem Alkohol gesättigte Lösung von Pikrinsäure 9 Teile, der unmittelbar vor Gebrauch 1 Teil neutrales Formol zugesetzt werden, während 6 Stunden (MITCHELL und WISLOCKI 1944); 3. CARNOYSche Flüssigkeit (6 Teile absoluter Alkohol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig), welche nach unseren Erfahrungen ein ausgezeichnetes Fixierungsmittel für die nachfolgende Glykogendarstellung ist (vgl. auch ROMEIS 1948, 1950), während 4 Stunden.

Zur Fixierung mit absolutem Alkohol legten wir die Leberstückchen auf Porzellan-siebchen, um die Entwässerung zu beschleunigen; aus dem gleichen Grund wechselten wir den Alkohol nach 6 und 12 Stunden. Die in der alkoholischen Pikrinsäure-Formollösung und in CARNOY fixierten Stückchen wurden zur Entwässerung ebenfalls auf Porzellan-siebchen durch 3 Portionen absoluten Alkohol durchgeführt, wobei sie in jeder eine Stunde belassen wurden.

Nach dem absoluten Alkohol wurden alle Stückchen durch 3 Bäder Methylbenzol (je 4 Stunden) und 3 Bäder Benzol (je 5 Minuten) in Paraffin gebracht, das nach 6 und

Abb. 1 und 2. Leber. Polysaccharidreaktion nach BAUER, Kernfärbung mit saurem Hämalaurin nach MAYER. Vergr. 1 : 240. Fix.: CARNOY. Abb. 1 ohne, Abb. 2 nach Diastasebehandlung

Abb. 3 und 4. Leber. Silbermethode nach PRITCHARD, Kernfärbung mit Kernechtrot. Vergr. 1 : 240. Fix.: absoluter Alkohol. Abb. 3 ohne, Abb. 4 nach Diastasebehandlung

Abb. 5 und 6. Leber. Silbermethode nach MITCHELL und WISLOCKI, Kernfärbung mit Kernechtrot. Vergr. 1 : 240. Fix.: Alkohol-Pikrinsäure-Formol-Gemisch. Abb. 5 ohne, Abb. 6 nach Diastasebehandlung

Abb. 1

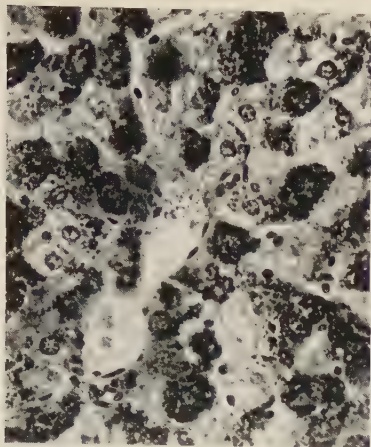


Abb. 2

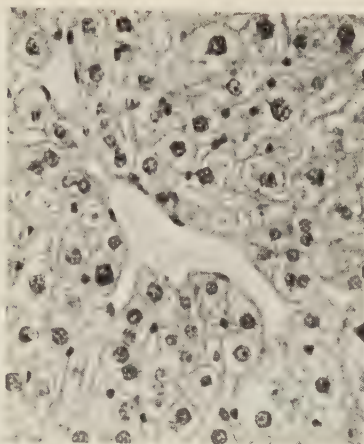


Abb. 3

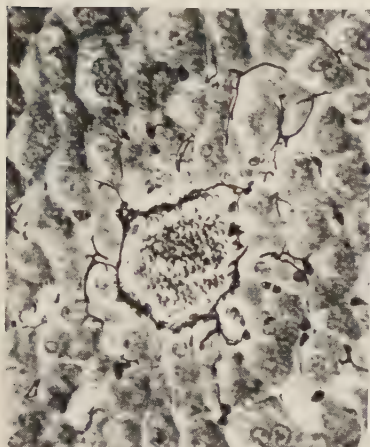


Abb. 4

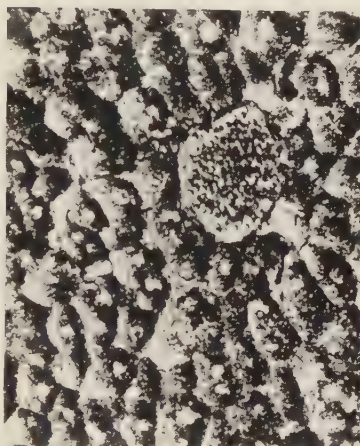
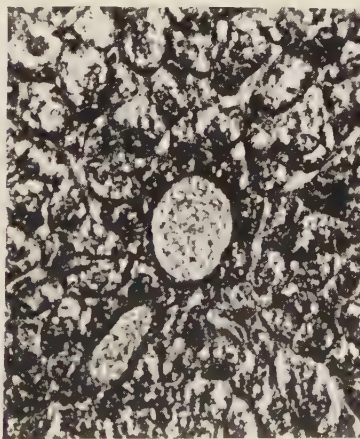


Abb. 5



Abb. 6



12 Stunden gewechselt wurde. Dann gossen wir die Blöcke. Von jedem Block wurde eine Serie von 6 μ Schnittstärke angefertigt. Die Schnitte wurden, um jeden Glykogenverlust zu vermeiden, auf 85%igem Alkohol gestreckt, und je zwei auf einem Objektträger mit Eiweißglyzerin aufgeklebt. Nach dem Entparaffinieren wurden die Objektträger nach den Angaben von ROMEIS (1948) mit einer Celloidinschicht überzogen. Als dann gingen wir folgendermaßen vor:

Gruppe A: Zur Glykogendarstellung verwendeten wir neben den beiden Silbermethoden, die genau nach den Angaben von MITCHELL und WISLOCKI (1944) und PRITCHARD (1949) gehandhabt wurden, die BAUERSche Polysaccharidreaktion, von



Abb. 7. Leber. Silbermethode nach PRITCHARD, Kernfärbung mit Kernechtrot. Vergr. 1 : 240. Fix.: CARNOY



Abb. 8. Leber. Silbermethode nach MITCHELL und WISLOCKI, Kernfärbung mit Kernechtrot. Vergr. 1 : 240. Fix.: CARNOY

der ROMEIS (1948) sagt: „Die Methode hat die Bedeutung einer histochemischen Reaktion und ist zur Zeit das beste Verfahren zur morphologischen Darstellung des Glykogens. Ähnlich wie die BESTsche Methode bringt sie auch die kleinsten Glykogenanteile in leuchtendem Rot zur Darstellung. Ihre einfache Technik, die geringen Herstellungskosten und lange Haltbarkeit des Reagens, der Wegfall jeder subjektiven Differenzierung infolge des automatischen Ablaufes der Reaktion, die Schärfe und ausgezeichnete Sichtbarkeit der Färbung geben ihr sogar eine gewisse Überlegenheit über die BESTsche Färbung.“ Alle drei Färbungsmethoden wurden nach allen angegebenen Fixierungsarten ausgeführt.

Gruppe B: Zur Kontrolle, ob die gefärbte Substanz wirklich Glykogen ist, gelangten an Schnitten aus denselben Blöcken, nachdem sie mit Celloidin überzogen worden waren, jedoch vor der Färbung beziehungsweise Imprägnation, die folgenden Verfahren zur Anwendung: Einstellen in 1. eine 1%ige Lösung von gereinigter kristallisierter Diastase (Merck) während 45 Minuten bei 36°C; oder 2. 5%ige Trichloroessigsäure während 1 Stunde bei 58°C; oder 3. 25%ige Lösung von Speichel während 30 Minuten bei 36°C (PRITCHARD 1949). Anschließend an jede von diesen drei Behandlungsarten wurden die Schnitte gründlich in destilliertem Wasser ausgewaschen. Jeder zweite Objektträger wurde mit einem dieser Kontrollverfahren behandelt:

(Gruppe B₁), während die dazwischen gelegenen gleichlange Zeit bei der entsprechenden Temperatur in destilliertem Wasser belassen wurde (Gruppe B₂). Die einander entsprechenden Schnitte der Gruppen B₁ und B₂ wurden anschließend zusammen gefärbt, beziehungsweise imprägniert.

Befunde

In allen Präparaten der Gruppen A und B₂, die nach dem BAUERSchen Verfahren gefärbt worden waren, ist die Reaktion stark positiv. In den Randpartien ist regelmäßig das als „Alkoholflucht des Glykogens“ bekannte Phänomen festzustellen. Am ausgeprägtesten ist diese Erscheinung in den mit Alkohol fixierten Präparaten, etwas weniger nach der Pikrinsäurefixation, und am wenigsten breit ist diese Randzone nach CARNOY-Fixation. Im Inneren der Schnitte findet sich das Glykogen in größeren und kleineren Körnchen, die regelmäßig über die ganze Zelle verteilt sind (Abb. 1). Nicht alle Zellen enthalten gleichviel davon, sondern die einen mehr, andere weniger. Glykogenfreie Zellen sind sehr selten anzutreffen. Auf Querschnitten durch Leber-
 äppchen läßt sich keine gesetzmäßige Verteilung des Glykogens feststellen (Abb. 1; vgl. auch ROMEIS 1950).

In den mit Diastase und Trichloressigsäure behandelten Schnitten der Gruppe B₁ ist mit der BAUERSchen Reaktion kein Glykogen mehr nachweisbar (Abb. 2). Anders verhält es sich bei den mit 25%iger Speichellösung behandelten Präparaten: in diesen ist das Glykogen nur stellenweise herausgelöst; in den meisten Zellen ist noch Glykogen enthalten, wenn auch weniger als in den Präparaten der Gruppen A und B₂.

Aus diesem Grund haben wir in einer weiteren Versuchsreihe (Gruppe C) sowohl die Einwirkungszeiten von 25%iger Speichellösung variiert, als auch bei verschiedenen Zeiten die Wirkung von reinem Speichel nachgeprüft. Wir sind zu folgenden Ergebnissen gekommen: eine 25%ige Speichellösung löst, auf Grund der BAUERSchen Methode beurteilt, auch nach zweistündiger Einwirkung nicht alles Glykogen aus den mit einer Celloidinschicht überzogenen Schnitten heraus. Nach der Einwirkung von reinem Speichel dagegen erhält man schon nach einer Stunde keine BAUERSche Glykogenreaktion mehr, außer wenn der Schnitt nicht ganz gestreckt ist und Falten bildet. In diesen „Verdickungen“ finden sich noch Glykogenreste.

Die nach PRITCHARD versilberten Präparate der Gruppen A und B₂ zeigen in allen Zellen das ganze Protoplasma leicht bräunlich gefärbt und außerdem reichlich dunkelbraune bis schwarze Silberkörnchen (Abb. 3). Zellen, die keine Silbergranula enthalten, haben wir keine gefunden. In den Randzonen der Präparate findet sich der Silberniederschlag in der der Präparatoberfläche abgewendeten Zelseite; er weist eine halbmondförmige Gestalt auf und ist ziemlich kompakt. Nach CARNOY-Fixierung fällt die Reaktion immer sehr schwach aus (Abb. 7), doch sind die Zellgrenzen, und besonders die Endothelien der Sinusoide in diesen Präparaten intensiv mit Silber beladen. Bei allen angewendeten Fixierungsarten färben sich immer einzelne argyrophile Fasern mit (Abb. 3, 7).

In den mit Diastase, 25%igem Speichel oder Trichloressigsäure behandelten Präparaten der Gruppe B₁ ist die PRITCHARDSche Silberreaktion in allen unseren Schnitten durchwegs stärker, als in denjenigen der Gruppen A und B₂ (Abb. 4). In den Zellen sind die dunkelbraunen bis schwarzen Silberkörnchen zahlreicher und meist größer als in den Kontrollpräparaten. Die halbmondförmigen Gebilde in den randnahen Zellen fallen durch ihre intensive Schwärzung besonders auf. Ebenso färben sich bedeutend mehr argyrophile Fasern mit.

Die nach MITCHELL und WISLOCKI versilberten Präparate der Gruppen A und E haben große Ähnlichkeit mit den nach PRITCHARD hergestellten. Doch sind viel mehr argyrophile Fasern mitgefärbt (Abb. 5). Die erstere Methode gibt nach CARNOY Fixation fast gleich stark positive Resultate, wie nach Alkohol-Pikrinsäure-Formol-Lösung (Abb. 8).

Nach der Einwirkung von Diastase, 25 %igem Speichel oder Trichloressigsäure sind in den Präparaten der Gruppe B₁ die schwarzen Silberkörnchen in den Zellen eher noch vermehrt, wenn auch das Protoplasma als Ganzes weniger gebräunt erscheint als in den Präparaten der Gruppen A und B₂ (Abb. 6).

Diskussion

Die Reduktion von alkalischer Silberlösung wird in der organischen Chemie als Nachweis von aliphatischen Aldehyden, zu denen auch die Abbauprodukte des Glykogens (Dextrine, Maltose, Glukose) gehören, verwendet (KARRER 1941). Das Reduktionsmittel ist der betreffende Zucker selbst. Wenn wir anderseits ein Reduktionsmittel, wie z. B. Formol, zugeben, können wir in vitro aus vielen Silberverbindungen seien sie nun salzartiger oder komplexer Natur, metallisches Silber ausfällen. Eine besondere Substanz, die als solche unsichtbare und erst durch Formol „entwickelte“ Keime bildet, ist also nicht unbedingt nötig. Es ist nun kaum möglich, daß sich in histologischen Schnittpräparat ein Silbersalz nur an ein einziges Substrat in der Zelle bindet. Immer werden verschiedene organische Substanzen mit dem Silber Verbindungen eingehen. Das in diesen Verbindungen gebundene Silber wird entweder durch diese selbst oder aber erst durch das Reduktionsmittel zu metallischem Silber reduziert. An diesen primären Silberkeimen schlägt sich bei der Entwicklung mit Formol oder anderen reduzierenden Substanzen weiteres metallisches Silber nieder, das an der übersättigten Lösung stammt, die sich im Gewebe während der Behandlung mit der ammoniakalischen Silberlösung gebildet hat; so wächst der Keim zu mikroskopischer Größe heran (ZEIGER 1938). Wir können daher aus der Menge und Größe der im histologischen Schnitt sichtbaren Silbergranula in keiner Weise Rückschlüsse auf die Quantität desjenigen Stoffes ziehen, an dem sich der Primärkeim gebildet hatte. Eine quantitative Abschätzung der Glykogenmenge nach den Verfahren von MITCHELL und WISLOCKI (1944) und PRITCHARD (1949) ist also unmöglich. In dieser Beziehung stehen diese beiden Methoden weit hinter der BAUERSchen Reaktion zurück. Denn diese verläuft wie eine progressive Färbung und ist daher praktisch frei von Willkür und Zufall.

Die Diastase sowie das Ptyalin bauen das Glykogen ab; es entsteht Maltose, die durch typischen Aldehydreaktionen gibt (KARRER 1941). Die Maltose diffundiert durch die Celloidinschicht in die wässrige Diastase- oder Speichellösung, und die BAUERSche Reaktion wird im Schnitt negativ. Mit der Diastaselösung selbst aber, in die nach der Behandlung der Schnitte die Maltose übergetreten ist, lassen sich die typischen Aldehydreaktionen ausführen (positive SCHIFFSche Probe; Reduktion von FEHLINGScher Lösung; Reduktion einer ammoniakalischen Silbernitratlösung).

Die beiden für Glykogen angeblich spezifischen Silbermethoden fallen an den mit Diastase oder 25 %igem Speichel behandelten Schnitten regelmäßig stärker aus, als in den unbehandelten Kontrollen. Dies ist ein Beweis dafür, daß nach dem Verschwinden aller Kohlehydrate andere Stoffe im Schnitt immer noch primäre Silberkeime bilden können, die sich mit Formol entwickeln lassen. „Diese Tatsache zeigt, wie es mit der Spezifität der Silberverfahren bestellt ist. Es ist völlig verfehlt, die Silberfärbung in dem Maße als spezifisch anzusehen, wie das vielfach noch von Seite

der Histologen geschieht und zur Identifizierung bestimmter Substrate benutzt wird. Sie zeigt weiter, daß die Reaktion bei den heute üblichen Verfahren der Vorbehandlung, Bekeimung und Entwicklung offenbar an Feinstrukturen einer bestimmten mikroskopischen Größenordnung und Form, deren submikroskopischer Aufbau allerdings innerhalb bestimmter Grenzen schwankt, besonders leicht gelingt. In manchen Fällen von Keimbildung muß auch an eine bevorzugte und geordnete Adsorption von Silber nach Art dichroitischer Metallfärbungen gedacht werden. Dies gibt uns jedenfalls Veranlassung, manchen Silberbildern von fixierten Geweben mit äußerster Vorsicht gegenüberzustehen (ZEIGER 1938).“

Dieselben Erfahrungen wie mit Diastase machten wir an den Schnitten, die mit Trichloressigsäure behandelt wurden: die BAUERSche Reaktion wurde negativ, während in den Silberpräparaten die Reaktion eher stärker wurde als in den unbehandelten Kontrollen. Trichloressigsäure ist eine ziemlich starke Säure (pH der 5%igen Lösung kleiner als 2). Eine solche Säure hydrolysiert das Glykogen quantitativ zu Glukose (KARRER 1941), die ebenfalls durch die Celloidinschicht hindausdiffundiert. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Silbergranula, die sich nach Trichloressigsäurebehandlung immer noch in den nach MITCHELL und WISLOCKI (1944) und PRITCHARD (1949) versilberten Präparaten finden, bestimmt nicht nur von Primärkeimen, die am Glykogen haften*, durch Entwickeln mit Formol gebildet werden, sondern auch aus Primärkeimen entstehen, die sich an anderen Zellbestandteilen bilden. Also auch in bezug auf die Spezifität sind diese beiden Methoden der BAUERSchen Reaktion unterlegen.

Von einer histochemischen Reaktion muß verlangt werden, daß sie ohne subjektive Differenzierung oder Entwicklung automatisch abläuft. Für den Glykogennachweis in histologischen Schnitten trifft dies bei der BAUERSchen Polysaccharidreaktion zu (ROMEIS 1948, 1950). Anders verhält es sich mit den von MITCHELL und WISLOCKI (1944) und PRITCHARD (1949) beschriebenen Silbermethoden. Bei ihnen wird mit Hilfe eines starken Reduktionsmittels „entwickelt“, und eben diese Entwicklung bedingt ihre Unsicherheit. Erstens wissen wir nicht, welcher Natur die Primärkeime sind, die da hervortreten, und zweitens ist der Entwicklungsvorgang bei allen Silbermethoden unberechenbar, launisch, wie man gewöhnlich sagt. Die beiden Silberverfahren zur Glykogendarstellung machen dabei nach unseren Befunden in dieser Beziehung keine Ausnahme. Diese Tatsachen beweisen, daß beide Verfahren für den histochemischen Glykogennachweis ungeeignet sind. Daß nach einer für Glykogen so ausgezeichneten Fixierung wie CARNOYSche Flüssigkeit beide Silbermethoden schlechte Bilder geben, spricht auch gegen einen spezifischen Glykogennachweis, viel mehr aber noch der Umstand, daß die Reaktion positiv wird, wenn alle Kohlehydrate weg sind.

Wenn PRITCHARD (1949) schreibt, daß die Silberbilder „leichter und mit besserem Kontrast photographiert“ werden können, als die nach BAUER gefärbten Schnitte, so zeigt unsere Abb. 1 deutlich, daß die Photographie eines der letzteren weder an Schärfe noch an Kontrast etwas zu wünschen übrig läßt (vgl. auch ROMEIS 1950).

Zusammenfassung

Die von MITCHELL und WISLOCKI (1944) und PRITCHARD (1949) beschriebenen Silbermethoden zur histochemischen Darstellung des Glykogens sind weder qualitativ noch quantitativ der BAUERSchen Polysaccharidreaktion ebenbürtig. Die Letztere ist und bleibt das bis heute beste Verfahren zum histochemischen Nachweis von Glykogen.

Schrifttum

BAUER, H.: Z. mikr.-anat. Forsch. **33**, 143 (1933). — GIROUD, A., et C. P. LEBLOND: Bull. Histol. Tech. micr. **11**, 365, 375 (1934); Arch. Anat. micr. **30**, 105 (1934). — KARRER, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, 7. Aufl., Leipzig 1941. — LIPP, W.: Protoplasma **40**, 275 (1951); Z. wiss. Mikr. **61**, 38 (1952). — MITCHELL, A. J., and G. B. WISLOCKI: Anat. Rec. **90**, 261 (1944). — PRITCHARD, J. J.: J. Anat., Lond. **83**, 30 (1949). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl., München 1948; Z. mikr.-anat. Forsch. **55**, 165 (1950). — WOLF-HEIDEGGER, G., und H. WALTHER MANN: Z. Vitaminforsch. **12**, 3 (1942). — ZEIGER, K.: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik, Dresden und Leipzig 1938.

[Eingegangen am 19. September 1952]

Aus der Anatomischen Anstalt der Freien Universität (Direktor: Prof. Dr. E. VON HERRATH) und der Forschungsabteilung der Freien Universität am Institut für Mikromorphologie (Deutsche Forschungshochschule, Leiter: Prof. Dr. H. RUSKA)

Cremolan, ein wasserlösliches Einbettungsmittel für histologische und elektronenmikroskopische Schnittpräparate

Von Willy Schwarz und Gerda Vester

Mit 2 Abbildungen

Es kam uns darauf an, eine Einbettungsmethode zu finden, die sowohl in der Histologie als auch in der Elektronenmikroskopie brauchbare Resultate liefert. Dabei haben wir auf folgende Punkte besonderen Wert gelegt: 1. Schnittfähigkeit der Einbettungsmasse bis herab zu einer Schnittdicke von $0,1 \mu$; 2. die Möglichkeit, das geschnittene Objekt mit Fermenten behandeln zu können; 3. Zeitgewinn bei der Einbettung der Objekte. Darüber hinaus müssen selbstverständlich alle Anforderungen erfüllt sein, die man normalerweise in der Histologie an ein Einbettungsmittel stellt. Dies ist in erster Linie die Vermeidung von Schrumpfungen im Objekt, weiterhin die Möglichkeit, die Schnitte mit den einschlägigen Methoden zu färben und sie dann als Dauerpräparate zu erhalten. Außerdem ist es erforderlich, das in die Einbettungsmasse eingeblockte Material möglichst unbegrenzt aufzubewahren, um gegebenenfalls eine begonnene Schnittserie jederzeit fortsetzen zu können.

Alle bislang bekannten Einbettungsmittel erfüllen nur jeweils einen Teil der genannten Anforderungen. Auch die Gefrierschneidemethode erfüllt diese Bedingungen nicht. Sie erlaubt zwar den fermentativen Abbau der Schnitte und vermeidet weitgehend Schrumpfungen im Objekt; es ist aber mit ihr nicht möglich, Dünnschnitte herzustellen. Außerdem kann man eine unterbrochene Schnittserie späterhin nicht lückenlos fortführen.

Nur eine Einbettungsmasse, die das Objekt so härtet, daß man von ihm Dünnschnitte anfertigen kann, ist für die Elektronenmikroskopie brauchbar. Diese Masse muß chemisch vollkommen indifferent sein und das Objekt so durchdringen, daß keine größeren Härtedifferenzen zwischen ihm und dem Einbettungsmittel entstehen. Außerdem muß dieser Stoff durch chemisch indifferente Lösungsmittel aus dem Schnitt

wieder entfernt werden können. Sowohl bei der Einbettung als auch bei der Lösung des Einbettungsmittels müssen Schrumpfungen des Objektes vermieden werden. Unter diesen Gesichtspunkten kommt ein wasserlösliches Einbettungsmittel den Anforderungen am nächsten.

Wir haben das von der Badischen Anilin- und Sodafabrik hergestellte Cremolan¹⁾ deshalb einer Prüfung unterzogen. Die Cremolanmarken sind Äthylenoxydpolykondensations- bzw. auch -polymerisationsprodukte verschieden durchschnittlichen Molekulargewichtes. Durch Mischung dieser verschiedenen „Cremolanmarken“ kann jeder gewünschte Härtegrad von der flüssigen Phase bis zur festen Konsistenz hergestellt werden. Cremolan ist leicht löslich in Wasser, Methanol, Benzol, Äthylalkohol, Aceton, Essigester, Toluol, Methylbenzoat, Benzylbenzoat usw. Nicht löslich ist Cremolan in Paraffinöl, Rüböl und Olivenöl. Es ist chemisch völlig indifferent, soweit wir dies bislang entscheiden konnten.

Zu Beginn unserer Untersuchungen waren die Schnitteigenschaften des reinen Cremolans zu prüfen. Das Ergebnis ist: lediglich die Cremolansorten 60 und 100 sowie deren Mischungen besitzen eine schneidbare Konsistenz. Weiterhin zeigt sich, daß Cremolan 60 ausgezeichnete Schnitteigenschaften besitzt, die es erlauben, auch Dünnschnitte noch unter $0,1\ \mu$ herzustellen. Zur Anfertigung der Schnitte bis hinab zu $1\ \mu$ diene uns das Schlittmiktrotom von JUNG (Heidelberg), für Schnittdicken von $1\ \mu$ bis $0,05\ \mu$ das Dünnschnittmiktrotom nach DANON und KELLENBERGER der Fa. Trüb-Täuber und Co. (Zürich). Cremolan 100 eignet sich in reiner Form nicht zur Herstellung von Schnitten, da es splittert. Mischungen zwischen Cremolan 60 und 100 sind bis zu einem gewissen Prozentsatz (mindestens noch bis zu 50:50) möglich, ohne die guten Schnitteigenschaften des Cremolans 60 zu beeinträchtigen.

Nach der Prüfung der Schnitteigenschaften des reinen Cremolans haben wir die Einbettung verschiedener Gewebe in Cremolan vorgenommen. (Sklera, Lunge, Leber, Muskulatur, Aorta, Knorpel, Nabelschnur und Haut.) In Anlehnung an die Paraffin- und Celloidineinbettung haben wir zunächst die Objekte stufenweise in Mischungen von niederpolymerem Cremolan und Wasser bis zum reinen Cremolan heraufgebracht. Dabei hat sich gezeigt, daß eine derartige Behandlung der Objekte nicht nur unnötig, sondern durchaus unzweckmäßig ist. Die Objekte quellen nämlich im allgemeinen in den Cremolan-Wassergemischen. Dabei haben wir nicht weiter untersucht, ob diese Quellung auf die Cremolan-Wassergemische oder auf die relativ lange Einbettungszeit zurückzuführen ist. Wir sind dann dazu übergegangen, die unfixierten oder fixierten Materialteile sofort in reines Cremolan 60 zu bringen. Die 2—5 mm-Stücke werden vorher kurz gewaschen und auf Fließpapier leicht abgetrocknet. Dies empfiehlt sich, um möglichst wenig Wasser in das Cremolan zu übertragen. Cremolan ist hygroskopisch und verliert durch Wasseraufnahme an Festigkeit. Man muß daher jede Berührung des Cremolans mit Wasser während des Einbettungsprozesses und auch während des Schneidens tunlichst vermeiden. Da man beim Einbetten aber zwangsläufig immer noch Spuren von Wasser in die Einbettmasse hineinbringt, muß man das Cremolan mindestens zweimal erneuern. Man wechselt es, sobald das Objekt in der ersten Cremolanfraktion untergesunken ist. Dies ist spätestens nach einer halben Stunde der Fall. Das Untersinken des Objektes ist ein Zeichen dafür, daß das Cremolan vollkommen ins Objekt eingedrungen ist.

¹⁾ Für die freundliche Überlassung der für die Untersuchungen benötigten Substanzen danken wir Herrn Prof. Dr. OETTEL von der B.A.S.F.

Cremolan 60 hat einen Schmelzpunkt von etwa 53° . Es genügt daher, die Einbettungsgefäße bei konstanter Temperatur von etwa 55° aufzubewahren. Kurz vor dem Gießen des Blockes wird das Cremolan noch einmal gewechselt. Etwa nach insgesamt anderthalb Stunden kann der Block in den für die Paraffineinbettung üblichen Einbettungsrahmen gegossen werden. Unmittelbar nach dem Gießen legt man den Block in den Eisschrank, wo er nach wenigen Minuten erstarrt ist. Damit ist er zum Schneiden fertig. Um eine nachträgliche Erweichung der Blöcke durch Luftfeuchtigkeit zu vermeiden, empfiehlt sich ihre Aufbewahrung in Flaschen mit eingeschliffenen Glasstopfen.

Das Schneiden erfolgt in der üblichen Weise, wobei immer darauf zu achten ist, daß das Wasser dem Block ferngehalten wird. Es ist deshalb auch nicht ratsam, den Block nach dem Schneiden längere Zeit im Mikrotom eingespannt zu lassen. Die Schnitte werden mit einer feinen Nadel in oberflächenentspanntes Wasser übertragen. Dabei löst sich das Cremolan augenblicklich, und die Gewebsschnitte sinken glatt ausgebreitet auf den Boden des Gefäßes. Das Wasser muß entspannt sein, damit die Schnitte auf der Wasseroberfläche nicht zerrissen werden. Als oberflächenaktives Mittel haben wir D-O-9/D²⁾ verwendet. Aus dem entspannten Wasser können die Schnitte wie Gefrierschnitte unbeschadet in reines destilliertes Wasser übertragen werden. Wir haben von allen Geweben, die wir erproben, mühelos auf dem Schlittenmikrotom Schnitte bis zu $2\ \mu$ herab anfertigen können. Nur die Sklera ließ sich nicht dünner als $8\ \mu$ schneiden.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen werden die Schnitte unmittelbar aus dem entspannten Wasser mit der befilmten Objektblende aufgefischt. Nach dem Auftrocknen des Schnittes auf der Blende werden etwa vorhandene Verunreinigungen durch kurzes Waschen in destilliertem Wasser entfernt.

Aufkleben der Schnitte auf den Objektträger. Die für histologische Untersuchungen vorgesehenen Schnitte werden aus destilliertem Wasser auf Objektträger aufgezogen. Schwierigkeiten macht die Befestigung der Schnitte auf dem Objektträger. Das Auftrocknen der Schnitte muß natürlich vermieden werden, um Schrumpfungen zu verhindern. Am besten hat sich die Methode nach IWANOFF und ANITSCHKOW (ROMEIS, 1948) bewährt. Wir verwenden dazu Eiweißglyzerin mit einem Zusatz von 5%igem Formol. Die mit dieser Mischung bestrichenen Objektträger werden kurz durch die Flamme gezogen. Zur Koagulation der Eiweißschicht betropfen wir das über dem Präparat liegende Filtrierpapier mit 40%igem Formol an Stelle des ebenfalls angegebenen absoluten Alkohols, um etwa durch Alkohol bedingte Schrumpfungen zu vermeiden. Unmittelbar danach werden die beschickten Objektträger in destilliertes Wasser gestellt, oder, falls die anzuschließende Färbung nicht gleich beginnt, zunächst in 50%igem Alkohol aufbewahrt. Die Schnitte haften nach dieser Aufklebemethode ganz ausgezeichnet und schwimmen auch bei großen Anforderungen (Versilberung) nicht ab.

Färbung. Um die Färbbarkeit der in Cremolan eingebetteten Präparate zu erproben, haben wir folgende Methoden angewendet: Hämalun-Eosin, Elastikafärbung nach WEIGERT, Azan, Fettfärbung mit Sudan III, Färbung mit Toluidinblau und die Bindegewebsversilberung nach Gömöri. Grundsätzlich ist zu sagen, daß sich alle Objekte mit den üblichen Farbeffekten darstellen und nicht der geringste negative Einfluß durch die Cremolan-Einbettung zu bemerken ist.

Eindecken der gefärbten Schnitte. Sofern man Imprägnationsmethoden oder Beizenfarbstoffe angewendet hat, deckt man die Präparate am besten in ein

²⁾ Eine nichtionogene Verbindung, Erzeugnis der B.A.S.F., Ludwigshafen.

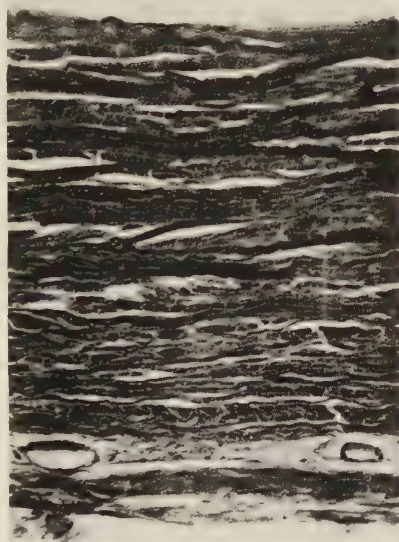
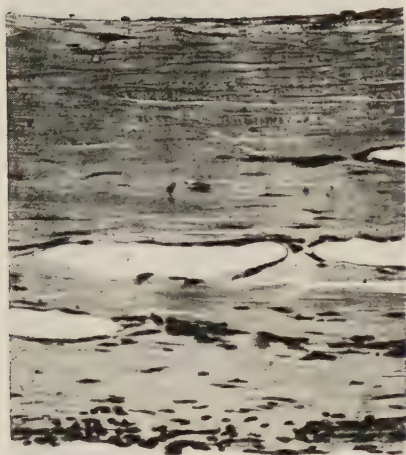


Abb. 1. Lichtmikroskopisches Bild eines Schnittes durch die Sklera eines 60 Jahre alten Mannes. Fixierung: Formalin. $10\ \mu$ geschnitten. Hämatoxylin-Eosin. Links Paraffineinbettung, rechts Cremolaneinbettung. 200:1.

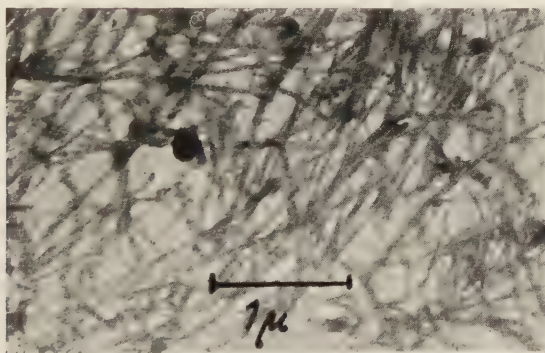


Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Bild eines Dünnschnittes von $0,1\ \mu$ Dicke durch den Rippenknorpel eines 2 Monate alten Säuglings. Fixiert. Ein großer Teil der Kittsubstanz durch Hyaluronidase entfernt. Einbettung in Cremolan. 18000:1.

wasserlösliches Mittel (z. B. Glyzeringelatine) ein. Dies Vorgehen ist am günstigsten, wenn hierbei jegliche Schrumpfung vermieden wird. Leider müssen wir aber nach Anwendung der meisten Färbungen auf diese Methode verzichten, weil die gebräuchlichen Plasmafarbstoffe in das wasserlösliche Eindeckmittel hineindiffundieren. Hier muß ein anderer Weg beschritten werden. Es hat sich gezeigt, daß man die Präparate bis zum 96%igen Alkohol hinaufführen kann, ohne daß wesentliche Schrumpfungen

auftreten. Erst im absoluten Alkohol und vor allem im Xylol schrumpft das Material. Man muß daher diese beiden Stufen vermeiden. Wir haben deshalb die Präparate auf dem 80%igen Alkohol über Terpeneol in Kanadabalsam gebracht. Bei diesem Verfahren treten keine nennenswerten Schrumpfungen auf.

Um uns ein Urteil über die Vorteile der Cremolan-Methode bilden zu können, haben wir Cremolan-Schnitte mit Paraffin-Schnitten desselben Objektes verglichen. Die Paraffineinbettung des Materials erfolgte über Methylbenzoat.

Sehr deutlich wird der Vorteil der Cremolaneinbettung an der Sklera sichtbar (Abb. 1). Im Paraffin-Schnitt sind zwischen den Faserbündeln überall kleine Risse zu erkennen, die man auf Schrumpfungen im Objekt zurückführen muß. Diese Schrumpfungen fehlen dem Cremolan-Schnitt völlig, Risse treten zwischen den Faserbündeln nicht auf. Das Bild des Cremolan-Schnittes ist im ganzen viel klarer, auch die Topographie der Zellen ist besser erhalten.

Abbildung 2 zeigt einen Cremolan-Dünnschnitt von etwa $0,1 \mu$ Dicke durch einen fixierten Rippenknorpel. Der Schnitt wurde mit Hyaluronidase behandelt, um die Kittsubstanz des Knorpels zu entfernen und das Fibrillengerüst hervortreten zu lassen. Die Aufnahme erfolgte im Siemens-Übermikroskop bei einer Strahlspannung von 80 kV. Ohne auf die Befunde am Knorpel näher einzugehen, soll hier nur die Brauchbarkeit der Cremolan-Methode demonstriert werden. Sie erlaubt es, einen Dünnschnitt anschließend fermentativ anzugehen. Damit ist für die Elektronenmikroskopie die Möglichkeit gegeben, einmal undurchstrahlbare Schnitte durch Fermentbehandlung aufzuhellen, zum anderen die Wirkung von Fermenten auf Schnitte zu kontrollieren.

Nach den Erfahrungen, die wir bislang gesammelt haben, läßt sich über die Cremolanmethode zusammenfassend folgendes sagen. Sie erfüllt im wesentlichen die von uns aufgestellten Forderungen:

1. Es ist uns kein Stoff bekannt, der bessere Schnitteigenschaften besitzt als Cremolan.
 2. Eine Nachbehandlung der Schnitte mit Fermenten ist möglich.
 3. Da die Einbettung nur anderthalb Stunden dauert, kann man schon nach sehr kurzer Zeit brauchbare Dauerpräparate erhalten.
 4. Schrumpfungen werden weitgehend vermieden.
 5. Die von uns angewendeten Färbungen sind gut durchführbar.
 6. Sofern die Blöcke unter Luftabschluß aufbewahrt werden, behalten sie ihre Konsistenz.
 7. Die Wasserlöslichkeit ist ein weiterer großer Vorteil, vor allem für die Elektronenmikroskopie. Dadurch können Alkohol, Xylol und andere Mittel vermieden werden.
- Die Eigenschaften der Cremolanmethode sind so gut, daß sich ihre Einführung in die histologische und elektronenmikroskopische Technik empfiehlt.

Die von amerikanischen Autoren (VAN HORNE und ZOPF 1951, CARSTEN 1949, BLANK 1949, CANIVENC und MAYER 1949) angegebenen Einbettungsmethoden tierischer und pflanzlicher Objekte in „Carbowax“ dürften der Einbettung in Cremolan entsprechen. Eine vergleichende Untersuchung beider Einbettungsmedien war uns leider nicht möglich, da Carbowax nur schwer zu erhalten ist und uns nicht zur Verfügung stand.

Schrifttum

- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. Leibniz-Verlag, München 1948. — VAN HORNE, R. L., and L. C. ZOPF: J. Am. Pharm. Ass. **40**, 31 (1951). — CARSTEN, M. E.: Arch. Path. **44**, 96 (1947). — BLANK, H.: J. Investigative Dermatol. **12**, 95 (1949). — CANIVENC, R., and G. MAYER: Compt. rend. soc. biol. Bordeaux, 9. Febr. 1949. — DANON, D., et E. KELLENBERGER: Arch. des Sciences, **3**, 171 (1950).

[Eingegangen am 20. September 1952]

Verbesserungen am Grundschlittenmikrotom mit automatischer Objekthebung Typ 1300 der Fa. E. Leitz

Von **Fritz Geiger**

Mit 4 Abbildungen

Jahrelange praktische Erfahrung mit dem Grundschlittenmikrotom Typ 1200 der Fa. E. Leitz und neuere Erfahrungen mit dem Typ 1300 veranlaßten mich zu den unten näher ausgeführten Verbesserungsvorschlägen.

Gegenüber dem Vorkriegstyp 1200 stellt der neue Typ 1300 eine Weiterentwicklung mit folgenden Verbesserungen dar:

1. Vollautomatische Objekthebung mittels verstellbarem Sternanschlag.
2. Vollkommene Verdeckung des Einstellmechanismus und damit annähernder Ausschluß einer Verschmutzung.
3. Allgemein schwerere Ausführung.

Das neue Modell Typ 1300 zeigte allerdings auch einige weniger befriedigende Ausbesserungen, die schon dem älteren Modell zum Teil anhafteten. Es waren an dem Typ 1300 folgende Mängel zu beanstanden:

1. Der bislang eingebaute μ -Bereich, der sich von 0—20 μ erstreckte, erwies sich als zu klein.
2. Der zur Bewegung des Grundschlittens angebaute Handgriff war technisch unzureichend ausgebildet.
3. Die serienweise Aufarbeitung von höheren Paraffinblöcken war unmöglich, da Blöcke nur bis zu einer Höhe von etwa 40 mm eingespannt werden konnten.
4. Die fabrikmäßige Ausstattung des Gerätes mit einem Doppelschraubenmesserhalter und einem solchen mit einer Messerhalteschraube ließ, insbesondere bei großflächigem Blockmaterial, keine schwingungsfreie Befestigung des Messers zu.

Auf Grund dieser Mängel, die bei der Durchführung der laufenden Arbeiten immer zu Schwierigkeiten führten, halte ich nachstehende Verbesserungsvorschläge¹⁾ für erforderlich.

1. Vergrößerung des μ -Bereiches

Die serienmäßige Ausführung des großen Grundschlittenmikrotoms Typ 1300 umfaßte bislang einen μ -Bereich von 0—20 μ . Eine Schnittdicke von beispielsweise 50 μ konnte immer nur annähernd erreicht werden. Man mußte in diesem Fall den Block

¹⁾ Durch freundliches Entgegenkommen der Fa. E. Leitz wurde mir die Möglichkeit der technischen Durchführung gegeben.

3mal um $16,666\dots \mu$ heben, wodurch das Spiel der Getriebezahnräder beim dreimaligen Transport (Objekthebung) die Ungenauigkeit der Schnittdicke groß wurde. Abgesehen davon, daß eine Einstellung von $16,666\dots \mu$ unmöglich ist.

Die Arbeitsweise am Anatomischen Institut erfordert es jedoch, daß manche Objekte in Serien geschnitten werden müssen, wobei die Dicken der einzelnen Schnitte oft Differenzen von etwa 100μ und mehr aufweisen. Die Herstellung von Serien mit

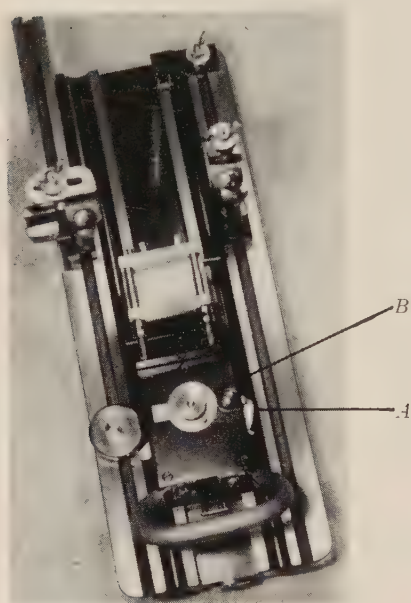


Abb. 1

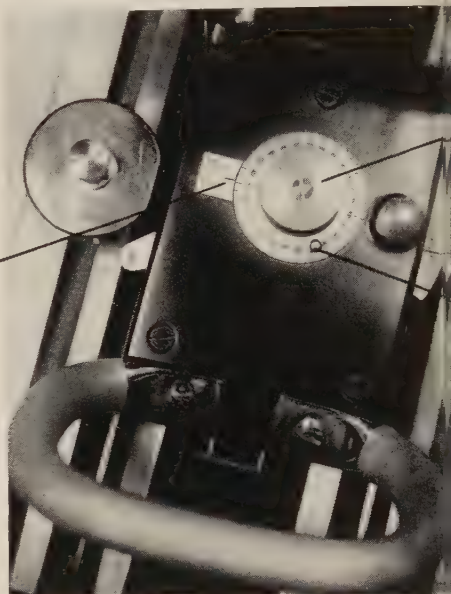


Abb. 2

wechselnder Schnittdicke war jedoch bisher mit keinem Mikrotom möglich. Die am Typ 1300 ausgeführten Änderungen erfüllen nun alle Anforderungen, die an ein Mikrotom in bezug auf Schnittdicke und den raschen Wechsel derselben gestellt werden können.

Das verbesserte Mikrotom besitzt einmal an der normalen μ -Einstellskala bereits einen um 20μ erweiterten Bereich von 0 bis 40μ (A in Abb. 1).

Hinzu tritt als völlige Neuerung ein Zusatzbereich von 0 bis 250μ (B in Abb. 1).

Mit Hilfe dieses zusätzlichen μ -Bereiches kann jeder weitere gewünschte μ -Betrag an einer μ -Teilscheibe unmittelbar eingedreht werden, so daß beim Vorschub des Objektschlittens der addierte μ -Betrag von beiden μ -Einstellskalen als Schnitt abgehoben wird. Diese Einstellung geht sehr rasch und genau vor sich und wird durch eine fixierte Null-Marke rechnerisch sehr einfach.

Technische Angaben:

a) Normale μ -Skala. Der normale μ -Bereich, der bei der früheren Ausführung des Geräts 20μ umfaßte, ist durch den Einbau einer entsprechenden Steigungsspindel auf insgesamt 40μ erweitert worden. Die Teilung ist in 2μ -Intervallen abgetragen. Bedienung und sonstige Ausführung wie bislang.

b) Zusätzliche μ -Teilscheibe. Auf dem Deckel des Objektschlittens wurde um den Drehknopf für die Objekthebung (D in Abb. 2) eine μ -Teilscheibe mit einem Bereich von 0— 250μ ange-

nacht. Diese Teilscheibe ist mit einer Teilung versehen, deren Abstände einer Objekthebung von μ entsprechen, wobei auf der Skala die Teilstriche in Abständen von 10μ mit Zahlen versehen sind. Mittels eines kleinen Knopfes (K in Abb. 2) auf der μ -Teilscheibe kann diese mit einer auf dem Gehäusedeckel fest angebrachten Nullmarke, links der Skala, auf ihre Nullmarke gebracht werden (NM in Abb. 2). Hierbei bleibt der Drehknopf (D) für die Objekthebung unbeeinflusst. Bei Objekthebung, also der Betätigung des Drehknopfes D , dreht sich jedoch die μ -Teilscheibe stets mit. Diese Konstruktionsbesonderheit ist beim Arbeiten mit der μ -Teilscheibe zu beachten. Mit der vorstehend beschriebenen Einrichtung ist es auf einfachste Weise möglich, fortlaufende Schnittserien von einer geringen μ -Dicke anzufertigen, in welche in gewissen Abständen dicke Schnitte eingeschoben werden. Hierbei ist für die Mikrotomarbeit wesentlich, daß für die Einstellung der einzelnen dicken Schnitte lediglich der Differenzbetrag zwischen der gewünschten μ -Zahl des dicken Schnittes und der an der Normalskala eingestellten μ -Zahl der fortlaufenden Serien an der zusätzlichen μ -Teilscheibe einzudrehen ist. Da, wie bereits erwähnt, bei der jeweiligen Null-Einstellung der zusätzlichen μ -Teilscheibe nach jedem dicken Schnitt sich der Drehknopf für die Objekthebung nicht mitdreht, ändert sich somit an der Einstellung der laufenden Serie nichts. Daher kann jeder beliebig dicke Schnitt jederzeit in eine laufende dünne Serie eingeschoben werden. Die maximale Dicke des Schnittes wird lediglich durch die technische Leistungsfähigkeit des Mikrotoms begrenzt.

Zusammenfassend kann ich auf Grund praktischer Erfahrungen der vergangenen Monate mit dieser Zusatzeinrichtung feststellen:

Fortlaufende Serien von geringer μ -Zahl, in welche einzelne dicke Schnitte in bestimmten Abständen eingelegt werden sollen, bereiten keinerlei Schwierigkeiten.

Sollen dagegen nur dicke Schnitte angefertigt werden, so ist es zweckmäßig, die normale μ -Skala auf die Null-Stellung zu bringen und nur mit der zusätzlichen μ -Teilscheibe zu arbeiten. Die Einstellung ist hierdurch wesentlich vereinfacht. Der Grundschlitten wird in die dem Arbeitenden zugekehrte Endlage gefahren und die gewünschte μ -Zahl des dicken Schnittes an der zusätzlichen μ -Teilscheibe von der Nullstellung ausgehend mittels des Drehknopfes D eingedreht. Beim Vorschub des Objektschlittens bleibt die automatische Transporteinrichtung außer Betrieb und es wird ein Schnitt von der gewünschten und eingestellten μ -Zahl abgehoben.

Auf diese Weise habe ich z. B. große Querschnitte von menschlichen Uteri nach besonderer Vorbehandlung in Stärke von 100 bis 450μ ohne besondere Schwierigkeiten angefertigt. Die Einstellung für die dicksten Schnitte wurde durch ein Weiterdrehen der zusätzlichen μ -Teilscheibe über 360° erreicht, wobei einer Drehung von $60^\circ = 250 \mu$ entsprechen. Die Errechnung der eingedrehten Gesamt- μ -Zahl gestaltet sich äußerst einfach.

2. Formänderung des Handgriffes

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, habe ich eine andere Formgebung für den Handgriff zur Betätigung des Grundschlittens angeregt. Der Zwang zu einer festgelegten und daher ermüdenden Haltung der arbeitenden Hand kommt dabei in Wegfall. Selbst in längeres Arbeiten an dem Gerät wirkt weit weniger ermüdend. Die Detailausbildung des halbkreisförmigen Handgriffes wurde der Fa. E. Leitz überlassen.

3. Erhöhungsschiene

Bei dem bisherigen Typ 1300 war nur eine Aufarbeitung von Paraffinblöcken bis zu einer Höhe von ungefähr 40 mm möglich. Sollten noch höhere Blöcke verarbeitet werden, dann müßte entweder eine Zerlegung in Teilblöcke erfolgen oder es konnte der erforderliche Messerabstand durch die Verwendung von hohen Distanzringen erreicht werden. Als Distanzringe wurden Säulen von 40 mm Höhe und einem Durchmesser von 30 mm eingesetzt. Im ersten Fall ergab sich stets ein großer Material-

ausfall; es konnte also keine lückenlose Serie mehr angefertigt werden. Im letzteren Fall war die schwingungsfreie Lagerung des Messers nicht mehr gewährleistet.

Zur Behebung dieser, in histologischen Laboratorien wohl bekannten Nachteile, regte ich folgende Lösung an: Zur Erhöhung der Lagerung des Messers über dem Objekthalter werden zwei sog. Erhöhungsschienen aufgesetzt (s. Abb. 3). Ihre Maße sind $40 \times 30 \times 200$ mm und $40 \times 30 \times 49$ mm. Längen und Breiten der Erhöhungsschienen entsprechen den Oberkantenmaßen der messertragenden Seitenteile des Mikrotoms. Die Höhe beträgt 40 mm.

Wie aus Skizze Abb. 4 ersichtlich ist, zeigt jede Erhöhungsschiene an der planmäßig bearbeiteten Oberseite das gleiche Profil wie die Oberseite der beiden Seitenwände

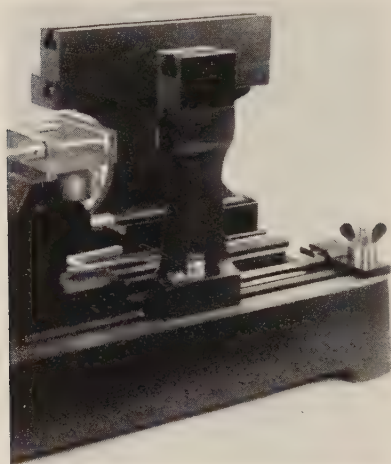


Abb. 3

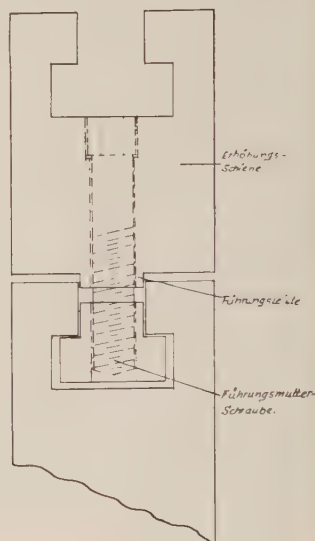


Abb. 4

Um ein seitliches Verschieben zu verhindern, befindet sich an der Unterseite der Erhöhungsschiene eine Führungsleiste, die in den engen Teil des Führungsschlitzes eingreift. Die Festsetzung der Schienen erfolgt durch zwei bzw. einer Führungsmutter-schrauben, deren speziell bearbeitete Mutter in den Führungsschlitz des Unterteils eingeschoben und mittels Winkelsteckschlüssel angezogen wird.

Mit dieser Ergänzungsausrüstung können Paraffinblöcke bis zu etwa 65 mm Höhe in einem Arbeitsgang in fortlaufender Serie geschnitten werden. Der Einbau der Erhöhungsschienen stellt eine wesentliche Verbesserung dar, durch die die bislang schon gegebenen konstruktiven Möglichkeiten des Typs 1300 erst voll ausgenutzt werden.

Die Bearbeitung von Blöcken solch großer Höhendimension ist gewiß nicht alltäglich, aber im gegebenen Fall gibt die Ergänzungsausrüstung der Höhenschienen eine Möglichkeit, auch höhere Objekte in lückenloser Serie zu schneiden.

4. Messerbefestigung

Bei der sehr vielseitigen Verwendungsmöglichkeit des Grundschlittenmikrotoms ist es sehr zweckmäßig, auf kleine Details zu achten, die zur einwandfreien Arbeitsweise des Gerätes beitragen. Daher erschien mir die schwingungsfreie Befestigung des

Messers sehr wichtig. Die serienmäßige Anlieferung des Gerätes mit zwei Messerhaltern mit beweglicher Unterlage, wovon der eine zwei und der andere nur eine Messerbefestigungsschraube hatte, erschien mir nicht als günstigste Lösung. Da die ganze Baukonstruktion, einschließlich der Ergänzung mit Erhöhungsschienen, ein sehr stabiles Ganzes darstellt, habe ich die Verwendung von zwei Messerklemmen mit beweglicher Unterlage mit je zwei Messerbefestigungsschrauben seit längerer Zeit in Gebrauch. Ein Schwingen des Messers ist dadurch ausgeschlossen. Die gleiche Anordnung hat sich auch als angebracht erwiesen beim Gebrauch der ebenfalls von Fa. E. Leitz entwickelten Messerklemmen mit seitlich abgebogenen Führungsschlitzen, die überdies noch einige andere Vorzüge aufweisen. Ich möchte hierbei ausdrücklich auf die vorzüglich konstruierten Messerklemmen der Fa. E. Leitz hinweisen, die mir bei richtiger Kombination als die besten erscheinen.

Zusammenfassung:

Es werden Verbesserungen am Grundschlittenmikrotom Typ 1300 angegeben, auf Grund deren das Mikrotom eine wesentlich umfassendere Verwendungsmöglichkeit erhält.

Herrn Prof. Dr. K. GOERTTLER danke ich für die Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

[Eingegangen am 8. Oktober 1952]

H. V. HIRSCH, Institut für Serologie und experimentelle Therapie an der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut) in München

Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte

Von **Th. v. Hirsch**, München

Mit 15 Abbildungen

In einer früheren Mitteilung¹⁾ ist schon darauf hingewiesen worden, daß für eine gute Abbildung histologischer Schnitte im Phasenkontrastmikroskop der Brechungsindex des Einschlußmediums von großer Bedeutung ist. Weitere Versuche sowie theoretische Überlegungen haben neue Möglichkeiten zur Verbesserung des Phasenkontrastbildes eröffnet, über welche im folgenden berichtet wird.

I. Glasfaden als Modellobjekt

Das Prinzip der Phasenkontrastabbildung setzt das Vorhandensein von Unterschieden im Brechungsindex innerhalb des Präparates voraus. Das zwischen Objektträger und Deckglas eingeschlossene Präparat besteht nun aus einem beliebigen Objekt und dem Einschlußmedium. Wir wollen zunächst ein denkbar einfaches Objekt, einen zylindrischen strukturlosen Glasfaden von etwa 6—8 μ Dicke, als eine Art Modell-

¹⁾ TH. V. HIRSCH: Zs. wiss. Mikroskopie **61**, 68 (1952).

objekt untersuchen. Die einzige Variationsmöglichkeit im Präparat liegt bei vorgegebenem Objekt in der Veränderung des Brechungsindex des Einschlußmediums. Zunächst einmal ist klar, daß farblose durchsichtige Objekte, ebenso wie mit freiem Auge, auch im gewöhnlichen Mikroskop sichtbar sind. Wir werden daher diesen Fall mit einbeziehen.

In Abb. 1 sind in der obersten Reihe Aufnahmen des Glasfadens mit dem gewöhnlichen Objektiv 16/0.32, Beleuchtungsapertur gleich Objektivapertur, Gesamtvergrößerung 250fach, wiedergegeben, welche mit verschiedenen Brechungsindices n_E des Einschlußmediums gemacht sind. Die Werte von n_E sind unterhalb der Bilder angeschrieben. Es wurde mit Gelbfilter und orthochromatischen Platten gearbeitet, so daß nur der gelb-grüne Spektralbereich der Lichtquelle wirksam war. Der Brechungsindex des Glasfadens war $n_G = 1.543$. Aus den Bildern ist folgendes ersichtlich:

1. Innerhalb des Bereiches von etwa $n_G - n_E < \pm 0.03$ sind die Bilder äußerst flau bis unsichtbar und konnten deswegen in Abb. 1 nicht wiedergegeben werden.
2. Brauchbare Bilder erhält man nur außerhalb dieses Bereiches. Hier sind die Konturen des Glasfadens als scharfe Linien zu erkennen.
3. Sowohl für $n_G > n_E$ als auch für $n_G < n_E$ erscheinen die Konturen dunkel.

Es ist eine altbekannte Tatsache, daß man durch Verkleinerung der Beleuchtungsapertur die Sichtbarkeit von farblosen Objekten verbessern kann. Um den Effekt möglichst deutlich zu machen, wählen wir als Kondensorblende die zum Phasenobjektiv Ph 16/0.32 gehörige sehr schmale Ringblende, aber unter Beibehaltung des gewöhnlichen Objektivs 16/0.32. Die Breite dieser Ringblende ist wesentlich kleiner als der Radius der ganz zusammengezogenen Irisblende des Hellfeldkondensors. Wir beobachten folgendes:

1. Innerhalb des Bereiches von etwa $n_G - n_E < \pm 0.03$ (natürlich mit Ausnahme von $n_G = n_E$) erhält man im Gegensatz zum oben betrachteten Fall noch brauchbare Bilder.
2. Es gibt zwei verschiedene Einstellungen mit größtem Bildkontrast, die um etwa 10μ auseinanderliegen (gemessen an der Mikrometerteilung des Feintriebess). In der Mitte zwischen diesen beiden Einstellungen liegt die theoretische Scharfeinstellung, bei welcher das Bild praktisch unsichtbar wird.
3. Es sind auch hier in erster Linie die Konturen als ziemlich scharfe Linien zu erkennen. Die beiden Einstellungen zeigen entgegengesetzte Helligkeitsverteilung. (In Abb. 1 ist in der zweiten Reihe die Einstellung mit größerem, in der dritten diejenige mit kleinerem Objektabstand wiedergegeben.)
4. Auch beim Übergang von $n_G > n_E$ zu $n_G < n_E$ kehrt sich die Helligkeitsverteilung um.
5. Außerhalb des genannten Bereiches sind die unter Ziff. 2—4 beschriebenen sehr charakteristischen Erscheinungen nicht mehr deutlich zu beobachten. Das Bild wird durch das Auftreten von zusätzlichen Streifen kompliziert und verschlechtert.

Die beschriebenen Erscheinungen erklären sich folgendermaßen. Der durchsichtige Glasfaden ist im Mikroskop dann nicht sichtbar, wenn alles von ihm ausgehende Streulicht in das Objektiv gelangt und außerdem die Einstellung des Mikroskoptubus der theoretischen Scharfeinstellung entspricht. Da der Winkelbereich des Streulichtes mit zunehmendem Unterschied der Brechungsindices von Glasfaden und Einschlußmedium wächst, ist die erste Bedingung bei der verwendeten Objektivapertur von 0.32 nur dann erfüllt, wenn dieser Unterschied genügend klein ist. Dies wird im Abschnitt IV zahlenmäßig erläutert werden. Der Glasfaden wird sichtbar, wenn man

durch Heben oder Senken des Mikroskoptubus nicht mehr auf das Objekt, sondern auf eine FRESNELSche Beugungserscheinung scharf einstellt. Voraussetzung für die Sichtbarkeit dieser Beugungserscheinung ist eine genügend kleine Beleuchtungsapertur.

Bei größerem Unterschied zwischen n_G und n_E gelangen die am Rande des Glasfadens um große Winkel abgelenkten Strahlen nicht mehr ins Objektiv, so daß die Randpartie als dunkle Linie erscheint, auf welche man bei ausreichender Beleuchtungsapertur scharf einstellen kann. Bei sehr kleiner Beleuchtungsapertur überlagern

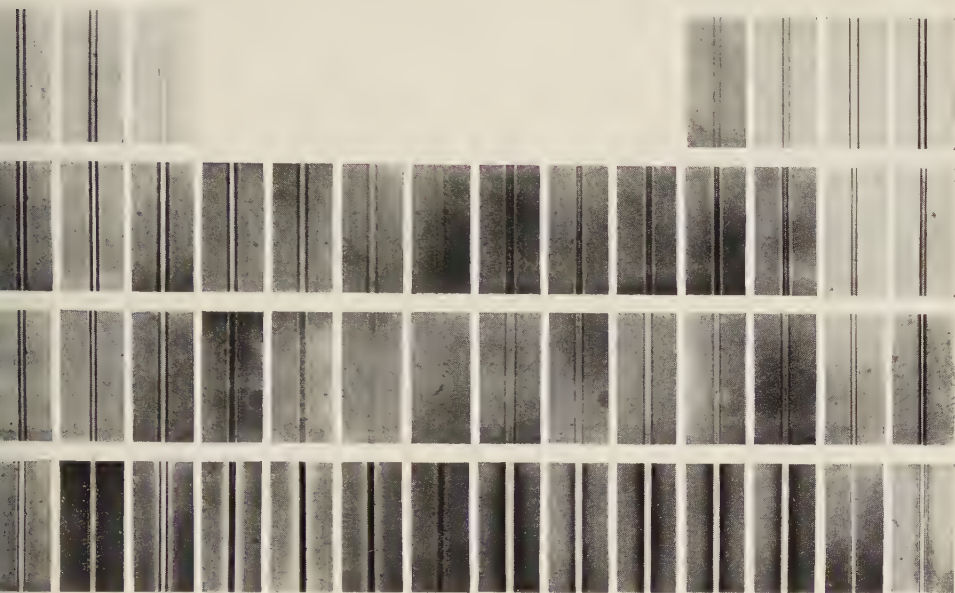


Abb. 1. Aufnahmen von 6—8 μ dicken Glasfäden. Obj. 16/0.32 Vergr. 250:1. 1. Reihe: Gewöhnliches Objektiv, Beleuchtungsapertur gleich Objektivapertur. 2. Reihe: Gew. Obj., Beleuchtung durch Ringblende, Objektabstand 5 μ zu groß. 3. Reihe: Dasselbe, Objektabstand 5 μ zu klein. 4. Reihe: Phasenobjektiv. Die Zahlen bedeuten den Brechungsindex des Einschlußmediums.

sich hier störend die beschriebenen Beugungserscheinungen, welche ihrerseits durch die Ausblendung des stärker abgelenkten Streulichtes kompliziert werden. Dadurch bekommt man Bilder mit schlecht definierter Scharfeinstellung und ungenügender Objektähnlichkeit.

Nun kommen wir zum Phasenkontrastbild. Das heißt, wir ersetzen das gewöhnliche Objektiv 16/0.32 durch das Phasenobjektiv Ph 16/0.32 unter Belassung der Ringblende. Die in der untersten Reihe von Abb. 1 wiedergegebenen Bilder zeigen:

1. Innerhalb des Bereiches von etwa $n_G - n_E < \pm 0.03$ (wiederum mit der selbstverständlichen Ausnahme von $n_G = n_E$) bekommt man scharfe und kontrastreiche Bilder und zwar mit gut definierter Scharfeinstellung.
2. Der Glasfaden ist als ein in seiner ganzen Breite gleichmäßig dunkler oder heller Balken dargestellt²⁾.

²⁾ Das verwendete Phasenobjektiv hat positiven Phasenkontrast, d. h. stärker lichtbrechende Körper erscheinen dunkler als ihre Umgebung. Ein Objektiv mit negativem Phasenkontrast würde Bilder mit der entgegengesetzten Helligkeitsverteilung geben.

3. Beim Übergang von $n_G > n_E$ zu $n_G < n_E$ kehrt sich die Helligkeitsverteilung um.
4. Außerhalb des genannten Bereiches sieht das Bild ähnlich aus wie bei Verwendung von Ringblende und gewöhnlichem Objektiv.

Es zeigt sich also sehr deutlich, daß nur dann eine wirkliche Phasenkontrastabbildung zustandekommt, wenn die gesamte vom Glasfaden ausgehende Streustrahlung ins Objektiv gelangt, wenn also der Glasfaden mit dem gewöhnlichen Objektiv bei der theoretischen Scharfeinstellung praktisch unsichtbar ist. Dies erfordert, daß bei Verwendung des Objektivs Ph 16/0.32 der Betrag von $n_G - n_E$ nicht größer als etwa 0.03 sein darf.

II. Gewebeschnitt

Wir wollen jetzt die Erfahrungen des Modellversuchs anwenden auf die Phasenkontrastabbildung eines ungefärbten Gewebeschnittes. Wir wählen hiezu einen $20\ \mu$ dicken Paraffinschnitt von formolfixiertem Rückenmark und zwar betrachten wir insbesondere die graue Substanz der Vorderhörner, welche die großen motorischen Nervenzellen enthält³⁾. Der entparaffinierte Schnitt wird in einer Reihe von Medien eingeschlossen, deren Brechungsindices in Schritten von 0.01 abgestuft sind.

Als erste bemerkenswerte Tatsache stellen wir fest, daß bei $n_E = 1.54$ das Phasenkontrastbild so flau ist, daß die Struktur des Gewebes praktisch unsichtbar bleibt. Dies zeigt uns, daß der Brechungsindex der grauen Substanz bei 1.54 liegt und daß die Unterschiede im Brechungsindex innerhalb der grauen Substanz sicherlich kleiner als 0.01 sind. So kleine Unterschiede sind auch im Phasenkontrast nicht mehr deutlich wahrnehmbar.

Es muß sogleich betont werden, daß dies keineswegs ein Ausnahmefall ist, sondern vielmehr die Regel darstellt. Zwischen sehr verschiedenartigen Bestandteilen eines Gewebeschnittes kommen wohl Unterschiede im Brechungsindex in der Größenordnung von 0.01 bis 0.02 vor. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle muß man aber damit rechnen, daß der betrachtete Teil des Gewebes einen ziemlich einheitlichen Brechungsindex hat.

Im Gegensatz zum Glasfaden ist der Gewebeschnitt aber ein poröses Material. Jedes Gewebe besteht in seinem ursprünglichen Zustand zum größeren Teil aus Wasser. Bei der Entwässerung bemüht man sich, sowohl die Schrumpfung als auch die Bildung von künstlichen mikroskopisch sichtbaren Hohlräumen als Folgen des Wasserentzuges nach Möglichkeit einzuschränken. Dies muß zur Folge haben, daß das entwässerte Gewebe eine submikroskopisch poröse Struktur hat. Deswegen sieht auch ein eingetrockneter Schnitt weiß aus. Im fertigen Präparat sind diese submikroskopischen Poren vom Einschlußmedium erfüllt. Jeder mikroskopisch auflösbare Strukturbestandteil besteht somit zu einem gewissen Bruchteil p seines Volumens aus fester Gewebesubstanz, während der Rest des Volumens vom Einschlußmedium erfüllt wird.

Wenn wir den Brechungsindex der reinen Gewebesubstanz wieder mit n_G bezeichnen, so können wir den wirksamen Brechungsindex n an der betrachteten Stelle des Präparates nach der Mischungsregel berechnen zu

$$n = p \cdot n_G + (1 - p) \cdot n_E$$

Allein dadurch, daß die Volumkonzentration p der reinen Gewebesubstanz innerhalb des Schnittes veränderlich ist, kommen die Unterschiede im Brechungsindex n zustande, welche die Phasenkontrastabbildung ermöglichen. Man hat es dabei in der

³⁾ Ich danke Herrn Prof. W. SCHOLZ für die freundliche Überlassung des hier verwendeten histologischen Materials.

Hand, n_E im Verhältnis zu n_G so abzustimmen, daß die Unterschiede des Brechungsindex n innerhalb des Präparates in der günstigsten Größenordnung liegen.

Diesen günstigsten Wert von n_E können wir nun leicht berechnen, wenn wir $n_G = 1.54$ setzen und mit Rücksicht auf die bei der Abbildung des Glasfadens gemachten Erfahrungen fordern, daß die größten Unterschiede von n innerhalb des Schnittes 0.02 betragen sollen. Nehmen wir z. B. an, daß p innerhalb des Schnittes zwischen einem Minimalwert von Null und einem Maximalwert von 0.8 schwankt, so ergibt sich für n_E der Wert 1.515, wobei n zwischen 1.515 für $p = 0$ und 1.535 für $p = 0.8$ liegt. Hätten wir für p eine Schwankung zwischen 0 und 0.1 angenommen, so hätte sich für n_E der Wert 1.340 ergeben⁴⁾. Dies ist aber annähernd der Brechungsindex des Wassers.

Ein Gewebe oder eine Zelle mit einem sehr hohen natürlichen Wassergehalt wird demnach im Phasenkontrastmikroskop am besten in seiner natürlichen wässrigen Umgebung dargestellt, während verhältnismäßig wasserarme Gewebe entwässert und in ein Einschlußmedium von geeignetem Brechungsindex gebracht werden müssen.

Ein Beispiel für den ersten Fall sind die im Mundspeichel sehr gut sichtbaren Plattenepithelzellen aus der Mundschleimhaut. Der zweite Fall ist wohl bei allen schneidbaren Geweben gegeben.

Wir kehren nun zu unserem Rückenmarksschnitt zurück. Durch Ausprobieren stellen wir fest, daß für die Darstellung der Struktur dunkel auf hellem Grund der günstigste Wert von n_E bei 1.51 bis 1.52 liegt, für die Darstellung hell auf dunklem Grund bei 1.56 bis 1.57, in Übereinstimmung mit obiger Überlegung. Wenn auch beide Bilder (Abb. 2 und 3) im Prinzip gleichwertig sind, so ist das erstere doch vorzuziehen, weil es mehr dem gewohnten Bild entspricht.

Zum Vergleich zeigt Abb. 4 das Bild eines gefärbten Schnittes (Nißlfärbung) mit gewöhnlicher Optik. Im Nißlbild sind nur die motorische Nervenzelle und die Gliazellen angefärbt, während im Phasenkontrastbild alle Strukturen dargestellt werden, wodurch das Bild einen ganz anderen Charakter bekommt. Man sieht aber, daß auch hier alle Einzelheiten, z. B. bei der großen Nervenzelle, gut herauskommen. Die größere Übersichtlichkeit des gefärbten Präparates und die Vollständigkeit des Phasenkontrastbildes können sich gegenseitig in mancher Beziehung ergänzen.

Die schädliche Wirkung eines falschen Einschlußmediums soll Abb. 5 veranschaulichen. Hier ist der Schnitt in Wasser eingeschlossen. Die große Nervenzelle in der Mitte des Bildes ist nur noch schlecht zu erkennen. Statt der richtigen Wiedergabe von Halbtönen sieht man nur noch ein unübersichtliches Gewirr von Konturen. Besonders deutlich sieht man am Kernkörperchen, wie an Stelle einer gleichmäßig dunklen Darstellung nur noch eine dunkle Randlinie sichtbar ist, während das Innere hell und wie ausgehöhlt erscheint.

Verwendet man Kanadabalsam oder Caedax zum Einschließen, so wird das Bild wegen des zu kleinen Unterschiedes zwischen n_E und n_G sehr flau ausfallen. Meist ist es bei Kanadabalsam ($n_E = 1.54$) noch dunkel auf hellem Untergrund, bei Caedax ($n_E = 1.55$) umgekehrt.

Das richtige Einschlußmedium sollte mit seinem Brechungsindex um 0.02 bis 0.03 unterhalb des Wertes für die wasserfreie Gewebesubstanz liegen. Nachdem dieser meist bei 1.54 bis 1.55 liegt, wird man mit $n_E = 1.52$ im allgemeinen gute Bilder mit dunkler Zeichnung auf hellem Untergrund erhalten.

⁴⁾ In beiden Beispielen ist nur der Wert von n_E angegeben, der kleiner als n_G ist. Es gibt jeweils noch einen zweiten Wert, der größer als n_G ist und in den obigen Beispielen 1.565 bzw. 1.740 beträgt.

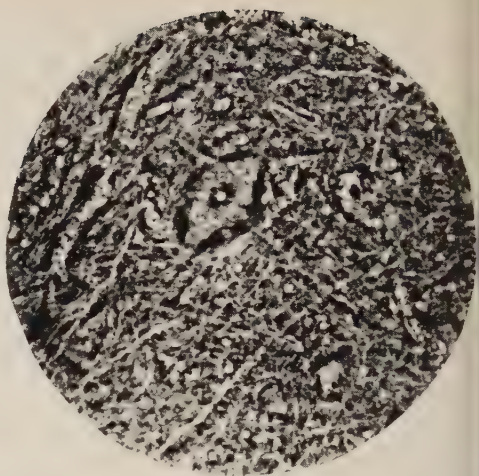
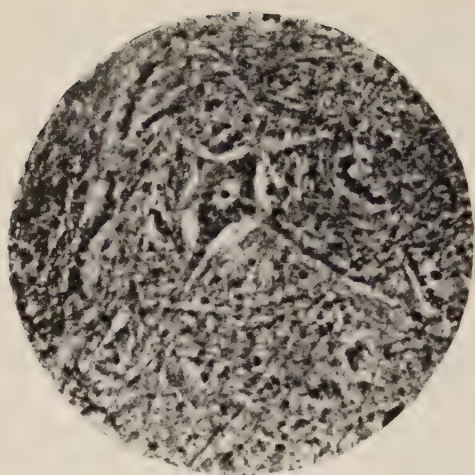


Abb. 2 und 3. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32 Vergr. 250:1.
 $n_E = 1.52$ und 1.56 .

III. Gebeizter Gewebeschnitt

Wir haben gesehen, daß man von ungefärbten Gewebeschnitten gute Phasenkontrastbilder bekommt, wenn man nur den Brechungsindex des Einschlußmittels richtig abstimmt. Weiterhin hat sich gezeigt, daß für die Entstehung des Bildes im wesentlichen die unterschiedliche Porosität des Gewebes maßgebend ist, während die sehr kleinen Unterschiede im Brechungsindex der reinen Gewebesubstanz eine nur

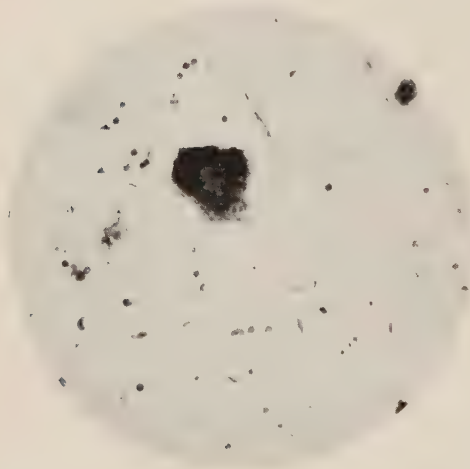


Abb. 4. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Nisslfärbung. Obj. 16/0.32. Vergr. 250:1.



Abb. 5. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1.
 $n_E = 1.33$.

untergeordnete Rolle spielen. Durch diesen Tatbestand werden die im Phasenkontrastverfahren liegenden Möglichkeiten ziemlich weitgehend eingeschränkt.

Stellen wir uns einmal vor, daß verschiedene Bestandteile des Gewebes deutlich verschiedene Brechungsindices hätten. Dann würden bis zu einem bestimmten Wert von n_E alle Strukturen dunkel erscheinen. Bei weiterer Erhöhung von n_E würde der Übergang von dunkler Zeichnung über unsichtbar bis zu heller Zeichnung für verschiedene Strukturen bei verschiedenen n_E -Werten sich vollziehen. Man könnte also allein durch entsprechende Wahl von n_E erreichen, daß manche Strukturen ganz unterdrückt würden, weil ihr Brechungsindex mit dem des Einschlußmediums übereinstimmt, während andere je nach ihrem größeren oder kleineren Lichtbrechungsvermögen dunkel oder hell erscheinen müßten. Es wäre also möglich, eine Differenzierung des Bildes lediglich durch die Wahl des Einschlußmediums zu erhalten.

Diesen angenommenen Fall kann man nun künstlich herbeiführen, wenn man die optischen Eigenschaften des Gewebeschnittes durch Adsorption von farblosen Substanzen verändert. Für den Erfolg ist entscheidend, daß die Adsorption selektiv ist, d. h. die verschiedenen Gewebestandteile verschieden stark adsorbieren und weiterhin, daß der adsorbierte Stoff einen von dem des Gewebes wesentlich verschiedenen Brechungsindex besitzt.

Es hat sich gezeigt, daß eine ganze Reihe von anorganischen Säuren, welche zur Bildung von komplexen Anionen befähigt sind, die geforderten Eigenschaften in mehr oder minder ausgesprochenem Maße haben. In erster Linie geeignet sind Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kieselwolframsäure, angesäuerte Lösungen von Natriumwolframat oder -molybdat, weiterhin Zinnchloridchlorwasserstoffsäure, Kaliumbichromat und sehr wahrscheinlich noch verschiedene andere Schwermetallsäuren. Aber auch organische Stoffe wie z. B. Tannin sind brauchbar.

Einige Beispiele sollen zeigen, was auf diesem Wege erreicht werden kann. Da der Brechungsindex des Gewebes durch Adsorption der stärker lichtbrechenden Substanzen erhöht wird, muß auch ein Einschlußmedium von höherem Brechungsindex verwendet werden. Von derselben Stelle eines Schnittes, der 24 Stunden in der betreffenden Lösung gebeizt war, bringen wir jeweils zwei Bilder, welche mit n_E -Werten gemacht sind, die um 0.02 auseinanderliegen. Der höhere n_E -Wert wurde so gewählt, daß eine möglichst gute Differenzierung eintritt, wobei die marklosen Nervenfasern fast unsichtbar sind. Beim niedrigeren n_E -Wert ist die Differenzierung noch sehr gering und nur in den ersten beiden Beispielen an den Kernkörperchen auffällig.

Kieselwolframsäure, 5%ige wässrige Lösung (Abb. 6 u. 7)

Es ist sehr auffällig, daß die Kernkörperchen in beiden Bildern hell erscheinen, offenbar weil sie nichts adsorbiert haben (mit $n_E = 1.52$ sind sie wieder dunkel). Die Erhöhung von n_E von 1.56 auf 1.58 gibt eine gute Differenzierung der Blutgefäße, welche sehr auffällig hell hervortreten und der dunkel erscheinenden Gliazellen. Die Nervenzellen sind sehr gut dargestellt, während die marklosen Nervenfasern fast unsichtbar geworden sind.

Phosphorwolframsäure, 5%ige Lösung in Butanol (Abb. 8 u. 9)

Phosphorwolframsäure verhält sich in wässriger Lösung wie Kieselwolframsäure. In organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Butanol, Butylacetat, Eisessig, Nitrobenzol verläuft die Adsorption insofern anders als die Gliazellen weniger stark adsorbieren. Daher treten sie bei $n_E = 1.59$ sehr deutlich hell hervor, ebenso wie die Blutgefäße. Die Nißschollen im Plasma der Nervenzellen sind hier nicht sichtbar. Die Kernkörperchen erscheinen wieder in beiden Bildern hell.

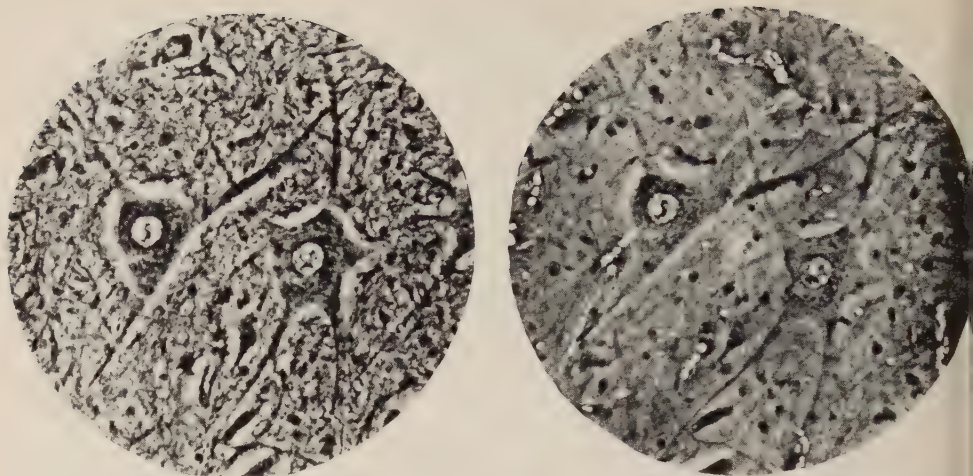


Abb. 6 und 7. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1.
 $n_E = 1.56$ und 1.58 . Gebeizt mit Kieselwolframsäure.

Angesäuerte Natriumwolframatlösung (Abb. 10 u. 11)

Eine 5%ige wässrige Natriumwolframatlösung gibt gar keine Adsorption. Wenn man die Lösung durch Zugabe von 10 ccm einer 2.5-normalen Salzsäure auf 100 ccm Lösung auf einen p_H -Wert von 3 bringt, bildet sich in der Lösung das komplexe Hexawolframat-Anion⁵⁾, welches sehr gut adsorbiert wird. Bei $n_E = 1.58$ sind die Gliazellen dunkel und sehr deutlich sichtbar, die Blutgefäße sind wieder hell. Die Nerven-

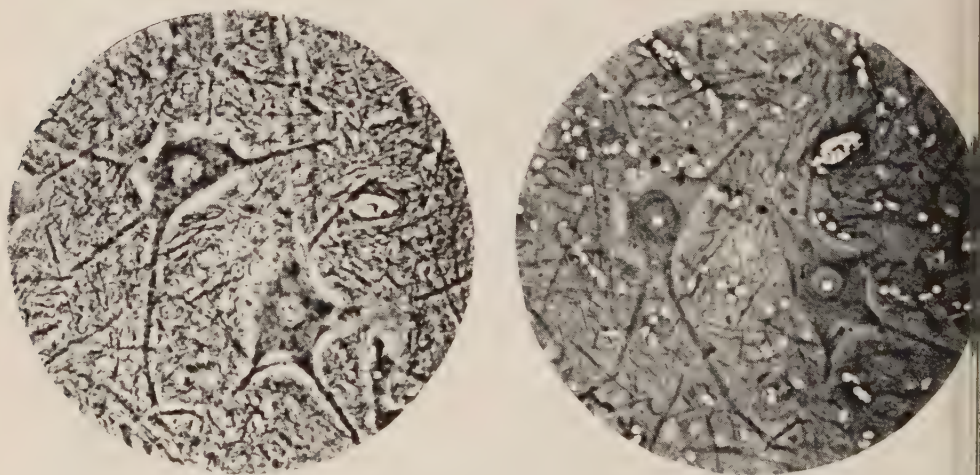


Abb. 8 und 9. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1.
 $n_E = 1.57$ und 1.59 . Gebeizt mit Phosphorwolframsäure in Butanol.

⁵⁾ G. JANDER und K. F. JAHR: Kolloid Beih. **41**, 1 u. 297 (1935).

llen mit den Nißschollen sind sehr deutlich. Diesmal adsorbiert auch das Kernkörperchen und erscheint in beiden Bildern dunkel.

Warum das Kernkörperchen in den beiden ersten Beispielen gar nichts adsorbiert, ist nicht klar. Die Erscheinung war bei allen Schnitten vom selben Block vollkommen reproduzierbar. Bei Durchmusterung verschiedener formolfixierter Rückenmark- und Gehirnpräparate zeigte sich, daß bei einem Teil derselben die Kernkörperchen auch adsorbierten und dunkel erschienen. Ein Einfluß des Einbettungsverfahrens (Paraffin-, Celloidin- und Gefrierschnitte) konnte nicht festgestellt werden.

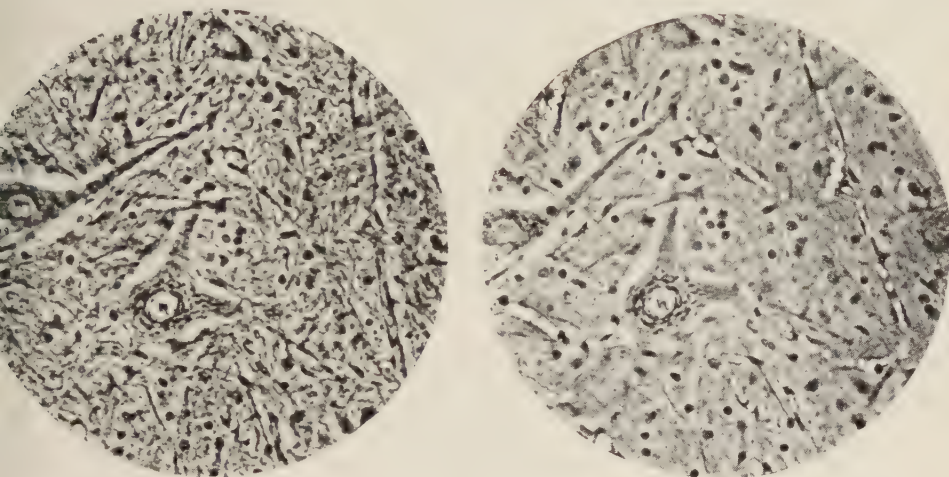


Abb. 10 und 11. Rückenmark, Paraffinschnitt 20μ , Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1. $n_E = 1.56$ und 1.58 . Gebeizt mit angesäuerter Natriumwolframatlösung.

Durch diese drei Beispiele sind natürlich die Möglichkeiten, die in der Methode der Adsorption farbloser Substanzen liegen, keineswegs erschöpft. Sie kann offenbar mit zwei verschiedenen Zielen angewendet werden. Einerseits ist sie ein Hilfsmittel, um schönere und differenzierte Phasenkontrastbilder zu erhalten. Sie kann aber auch im Studium spezifischer Adsorptionsvorgänge dienen, welche vom Standpunkt der Histochemie von Interesse sind.

IV. Theoretische Bemerkungen

Die Theorie des Phasenkontrastverfahrens verlangt, daß der durch das durchleuchtete Objekt von der Dicke d hervorgerufene Gangunterschied

$$(n_G - n_E) \cdot d / \lambda$$

klein ist, also etwa den Wert 0.1 nicht übersteigt. Wenn man für $(n_G - n_E)$ den erahrungsgemäß günstigsten Wert von 0.02 und für die Wellenlänge 0.5μ einsetzt, so ergibt sich als höchstzulässige Dicke 2.5μ . Dabei ist natürlich stillschweigend vorausgesetzt, daß das Objekt in seiner ganzen Dicke durch das Mikroskop fehlerfrei abgebildet wird. Dies ist aber keineswegs der Fall, sondern es wird nur eine Schicht von etwa 1μ oder weniger hinreichend scharf abgebildet. Die außerhalb dieser Schicht befindlichen Teile des Präparates bedingen nur mehr eine allgemeine Störung der Abbildung. Bei Objekten, deren Dicke die Größe von ungefähr 1μ übersteigt, ist für den

bei der Abbildung wirksamen Gangunterschied nicht die Dicke des Objektes, sondern die Schärfentiefe der mikroskopischen Abbildung in erster Linie maßgebend. Somit steht die Erfahrungstatsache, daß man auch dickere Objekte (z. B. die große Nervenzelle, deren Durchmesser etwa $40\ \mu$ beträgt und welche daher die ganze Dicke des $20\ \mu$ -Schnittes ausfüllt) gut abbilden kann, mit den Forderungen der Theorie nicht in Widerspruch. Man darf dabei natürlich nicht vergessen, daß die nicht scharf abgebildeten Schichten des Objektes eine Störung des Bildes verursachen, so daß der Dicke des Objektes praktisch eine Grenze gesetzt ist. Diese ist sehr von der Beschaffenheit des Objektes anhängig und kann daher nur durch den Versuch ermittelt werden.

Weiterhin muß gefordert werden, daß alles vom Objekt gestreute Licht ins Objektiv gelangt. Dies gilt nicht nur für die gebeugten, sondern ebenso für die gebrochenen Strahlen. Für nicht absorbierende Kugeln, deren Durchmesser als groß gegen die Wellenlänge betrachtet werden kann (d. h. etwa ab $d = 5\lambda = 2.5\ \mu$) hat H. BUCERIUS⁶⁾ die Lichtstreuung berechnet. Die Gesamtstreuung, bezogen auf die auf den Kugelquerschnitt auffallende Lichtmenge, kann man in mehrere Anteile zerlegen. Der erste ist das an der Kugeloberfläche reflektierte Licht, der zweite ist das nach zweimaliger Brechung durchgelassene Licht und der Rest ist das nach ein- oder mehrmaliger Reflexion im Inneren der Kugel durchgelassene Licht. Für eine Kugel vom Brechungsindex 1.54 ergeben sich für diese drei Anteile folgende Werte in Abhängigkeit von n_E :

n_E	refl.	durchg.	Rest
1,54	—	100%	—
1,52	0,4%	99,2%	0,4%
1,33	5,1%	90,7%	4,2%

Das nach zweimaliger Brechung durchgelassene Licht macht also den weitaus überwiegenden Teil des gesamten Streulichtes aus und wir werden uns daher auf die Betrachtung dieses Anteils beschränken.

Der maximale Ablenkungswinkel q bei einmaliger Brechung ist gegeben durch

$$\cos q = n_E n_G$$

Der maximale Ablenkungswinkel des nach zweimaliger Brechung durchgelassene Lichtes ist 2φ und die numerische Apertur des Streulichtkegels ist

$$n_E \cdot \sin 2\varphi$$

Für $n_G = 1.54$ ergeben sich folgende Werte für den Streuwinkel und die Apertur des Streulichtkegels in Abhängigkeit von n_E :

n_E	2φ	$n_E \cdot \sin 2\varphi$	Objektiv
1.54	0°	0	
1.53	$13^\circ 4'$	0.35	16/0.32
1.52	$18^\circ 30'$	0.48	
1.51	$22^\circ 40'$	0.58	
1.50	$26^\circ 10'$	0.66	40/0.63
1.33	$60^\circ 32'$	1.16	100/1.25

⁶⁾ BUCERIUS, H.: Optik **1**, 188 (1946).

der letzten Spalte sind die Objektive vermerkt, deren numerische Apertur ausreicht, um den Streulichtkegel voll aufzunehmen. Die für ein gegebenes Objektiv zutragenden Grenzen für n_E werden praktisch etwas weiter sein, weil beim Phasenkontrastmikroskop die Beleuchtung durch eine Ringblende erfolgt, also schiefe Beleuchtung verwendet wird.

Bisher haben wir nur mit dem Objektiv Ph 16/0.32 gearbeitet. Die dabei gewonnenen Erfahrungen stimmen mit dem rechnerischen Ergebnis befriedigend überein. Darüber hinaus zeigt aber die Rechnung, daß auch dichte Objekte, deren wirksamer

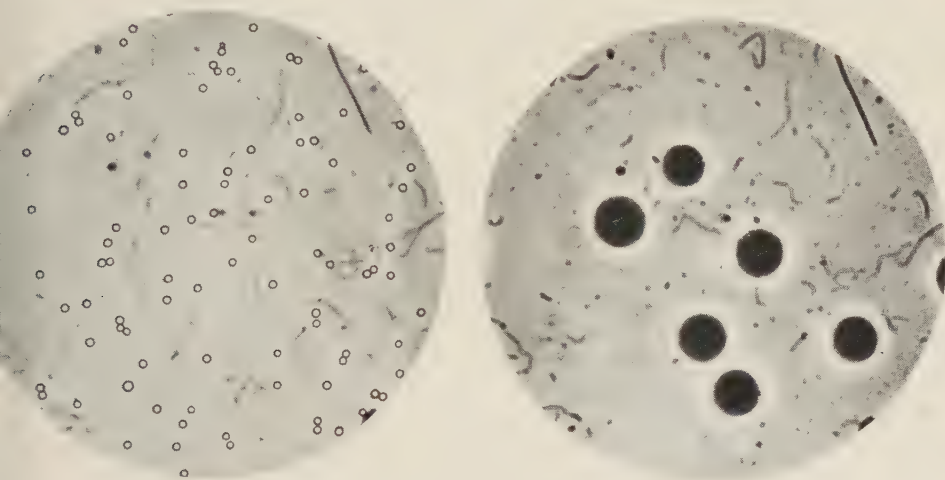


Abb. 12 und 13. Hammelblutkörperchen in physiolog. Kochsalzlösung. Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1 und Obj. Ph 100/1.25. Vergr. 1560:1.

Brechungsindex n nur wenig unterhalb dem Wert von $n_G = 1.54$ liegt, selbst in wässrigem Einschlußmedium gute Phasenkontrastbilder geben sollten, wenn man an Stelle des schwachen Objektivs die Ölimmersion verwendet. Dies soll an einigen Aufnahmen von Blutkörperchen nachgeprüft werden.

Eine Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung wird vergleichsweise mit dem schwachen Objektiv Ph 16/0.32 und mit der Ölimmersion Ph 100/1.25 abgebildet (Abb. 12 u. 13). Das erste Bild zeigt deutlich, daß das schwache Objektiv den ganzen Streulichtkegel nicht aufnehmen konnte. Deshalb scheinen die Blutkörperchen hell mit dunkler Begrenzungslinie. Die Ölimmersion hat eine richtige Phasenkontrastabbildung geliefert.

Die Richtigkeit der gegebenen Erklärung kann noch auf einem anderen Wege nachgeprüft werden. Wenn man auf dem Objektträger einen Tropfen der Blutkörperchenaufschwemmung mit einem Tropfen Wasser verdünnt, so tritt in der hypotonisch gewordenen Kochsalzlösung Hämolyse ein. Das Hämoglobin tritt aus den Blutkörperchen aus und parallel mit der Verminderung der Eiweißkonzentration in ihrem Innern wird auch ihr wirksamer Brechungsindex kleiner und nähert sich dem der umgebenden Flüssigkeit. Beobachtet man den Vorgang mit dem schwachen Objektiv Ph 16/0.32, so sieht man, wie die Blutkörperchen in ihrer ganzen Fläche tiefschwarz werden, um dann immer mehr zu verblassen bis zu dem zartgrauen Bild des Endstadiums. In Abb. 14 sind die verschiedenen Stadien der Hämolyse gut zu erkennen.

Statt den Brechungsindex der Blutkörperchen durch Hämolyse zu verkleinern kann man dieselbe optische Wirkung (nämlich eine Verkleinerung der Apertur des Streulichtes) auch dadurch erzielen, daß man den Brechungsindex des Einschlußmediums erhöht. Ein getrockneter Ausstrich von menschlichem Blut mit $n_E = 1.57$ eingeschlossen zeigt die nicht hämolysierten Blutkörperchen mit dem schwachen Objektiv Ph 16/0.32 wiederum als gleichmäßig dunkle Scheiben (Abb. 15).

Man muß demnach erwarten, daß auch Gewebeschnitte in wässrigem Medium mit der Ölimmersion gute Phasenkontrastbilder geben sollten. Dies wäre von größtem

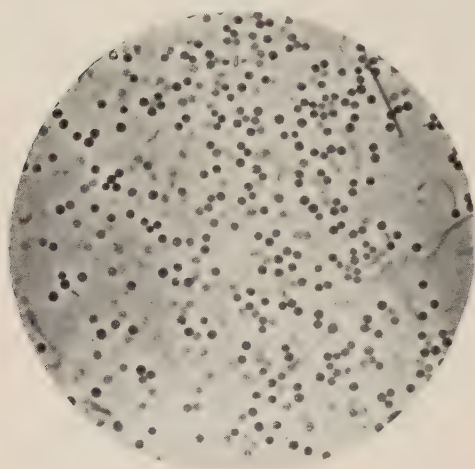


Abb. 14

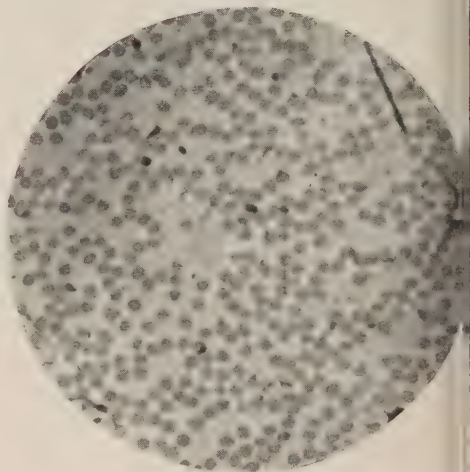


Abb. 15

Abb. 14. Hammelblutkörperchen, Hämolyse in hypotonischer Kochsalzlösung. Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1.

Abb. 15. Menschlicher Blutausstrich, Phasenkontrast. Obj. Ph 16/0.32. Vergr. 250:1. $n_E = 1.57$

Interesse für die Untersuchung unfixierter Schnitte in der natürlichen Körperflüssigkeit. Hier wird sich allerdings die störende Wirkung einer zu großen Schnittdicke, von der bereits weiter oben die Rede war, besonders stark bemerkbar machen, weil einerseits die Differenz $n_G - n_E$ besonders groß und andererseits die Schärfentiefe des Objekts besonders klein ist. Es besteht nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn es gelingt, von unfixiertem Material äußerst dünne Schnitte herzustellen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, verwendet man meist Quetsch- oder Zupfpräparate.

Die für die Apertur des Streulichtkegels gegebenen Zahlenwerte gelten nur für Kugeln, deren Durchmesser größer als etwa 2.5μ ist. Bei diesen ist der Streuwinkel nur von dem Verhältnis n_E/n_G abhängig, aber nicht von der Größe der Kugeln. Für kleinere Teilchen liegen die Verhältnisse ganz anders. Hier nähern wir uns immer mehr dem Grenzfall der reinen Beugung, wo der Winkelbereich des Streulichtes in erster Linie von der Größe der Teilchen bestimmt wird und zwar in dem Sinne, daß mit abnehmender Teilchengröße der Streuwinkel zunimmt. Dies führt in bekannter Weise dazu, daß bei Teilchen von der Größenordnung der Lichtwellenlänge dem Auflösungsvermögen des Mikroskops eine Grenze gesetzt ist.

V. Experimentelle Einzelheiten

Als Einschlußmedien wurden Flüssigkeitsgemische verwendet. Die meisten Flüssigkeiten sind für den vorliegenden Zweck nicht brauchbar, weil sie zu schnell verdunsten, gegen haben sich folgende sehr gut bewährt:

	$n_D(25^0)$	Siedepunkt
Stearat ⁷⁾	1.448	221—238 ⁰ bei 20 mm
Butylphthalat ⁸⁾	1.491	205—210 ⁰ „ 20 mm
Äthylbutylphthalat ⁸⁾	1.528	215—250 ⁰ „ 20 mm
Äthylbenzoat ⁸⁾	1.567	323 ⁰ „ 760 mm
Zimtsäurebenzylester ⁸⁾	1.601	240—244 ⁰ „ 25 mm
Bromnaphthalin	1.655	281 ⁰ „ 760 mm

Durch Mischen von jeweils zwei untereinanderstehenden Flüssigkeiten⁹⁾ wurde mit Hilfe eines ABBE'schen Refraktometers eine Reihe von 21 Einschlußmedien mit $n_D = 1.450, 1.460, \dots, 1.650$ hergestellt. Infolge des sehr geringen Dampfdruckes dieser Einschlußmedien sind die Präparate auch ohne Umrandung mindestens einige Monate haltbar.

Zur Fixierung des histologischen Materials eignet sich Formol und alle Mischungen aus Formol, Alkohol, Eisessig, Chloroform, wie z. B. CARNOY'sche Flüssigkeit. Fixierungsflüssigkeiten, welche im Gewebe Niederschläge hervorrufen, wie z. B. Bichromatmischungen, sollten nicht verwendet werden, weil diese Niederschläge einer Beizung des Gewebes im Sinne von Abschnitt III gleichkommen. Es ist aber zweckmäßiger, die Beizung gegebenenfalls erst am Schnitt vorzunehmen. Dies hat den Vorteil, daß man am selben Material verschiedene Beizen ausprobieren und auch ungebeizte Schnitte untersuchen kann, was man immer als erstes tun sollte.

Die Einbettung kann in Paraffin oder Celloidin erfolgen und es können auch ebenbürtig Gefrierschnitte verwendet werden. Die Schnittdicke kann unbedenklich bis zu $10\ \mu$ betragen. Geringere Schnittdicken geben etwas schärfere Bilder. Paraffinschnitte werden in Xylol entparaffiniert. Aus Celloidinschnitten wird das Celloidin mit einmal wechseltem Methylglykolacetat¹⁰⁾ herausgelöst. Da alle Bestandteile der beschriebenen Einschlußmedien sowohl mit Xylol als auch mit MGA mischbar sind, werden die Schnitte direkt aus dem Xylol bzw. MGA mit einem Tropfen Einschlußmedium abgedeckt. Gefrierschnitte werden mit MGA (nötigenfalls in steigender Konzentrationsreihe) entwässert und eingedeckt.

Wenn ein Paraffinschnitt gebeizt werden soll, kommt er aus dem Xylol über MGA und aqua dest. in die wässrige Beizlösung. Aus dieser über 1⁰/₀ige Essigsäure und MGA zum Eindecken. Bei nichtwässrigen Beizlösungen fallen aqua dest. und 1⁰/₀ige Essigsäure weg. Mit Celloidin- und Gefrierschnitten verfährt man sinngemäß ebenso. Die mit den beschriebenen nicht erhärtenden flüssigen Einschlußmedien eingedeckten Präparate sind naturgemäß gegen mechanische Beschädigung etwas emp-

⁷⁾ Hersteller: Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen.

⁸⁾ Hersteller: Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

⁹⁾ Zimtsäurebenzylester ist bei Zimmertemperatur kristallisiert, bleibt aber in geeigneter Mischung flüssig.

¹⁰⁾ Methylglykolacetat (MGA) ist ein technisches Lösungsmittel (Hersteller: Chemische Fabrik H. H. H. H. H., Oberhausen-Holten), welches mit Wasser, Xylol und fast allen organischen Lösungsmitteln unbeschränkt mischbar und ein sehr gutes Lösungsmittel für Cellulosenitrat ist. Es ist leicht zu leicht flüchtig (Siedepunkt 138—182, Verdunstungszeit etwa das 2¹/₂ fache von Xylol), hat einen schwachen Geruch und nicht gesundheitsschädlich.

findlich. Dafür hat man den Vorteil, daß durch Einstellen in MGA das Deckglas leicht abgelöst werden kann. So kann mit demselben Schnitt eine ganze Reihe von n_E -Werten ausprobiert werden. Selbstverständlich ist bei gebeizten Schnitten der günstigste n_E -Wert abhängig von der Einwirkungsdauer der Beizlösung und auch von den Adsorptionseigenschaften der Strukturelemente, welche besonders hervorgehoben bzw. unterdrückt werden sollen.

Bei ungebeizten Schnitten wird man im allgemeinen mit einem einzigen Einschlusmedium auskommen, dessen n_E -Wert bei 1.52 liegt. Man kann hierfür sehr gut das allgemeine Immersionsöl allgemein verwendete eingedickte Zedernholzöl ($n_E = 1.515$) verwenden, welches an der Luft rasch erhärtet und somit für Dauerpräparate besonders geeignet ist. Das Eindecken erfolgt über Xylol, da MGA aus dem Zedernholzöl einen unlöslichen Bestandteil ausfällt.

Es soll noch erwähnt werden, daß Phasenkontrastpräparate sich sehr gut für mikrophotographische Aufnahmen eignen, weil infolge der im Vergleich zum gefärbten Präparat geringeren Helligkeitsunterschiede eine für alle Teile des Bildes richtige Belichtung keine Schwierigkeiten macht.

Aus dem Labor des Verfassers

Mikrophotographie ohne Okular

Von F. Bode, Frankfurt/Main

Mit 6 Abbildungen

Es hat sich gezeigt, daß bei vielen Anwendungsarten der Mikrophotographie Aufnahmen ohne Okular zu besseren Bildern führen, als solche selbst mit besonders korrigierten Okularen. Im folgenden sollen die Möglichkeiten dieser Technik gezeigt werden.

Für alle Aufnahmen wurden gleiche Beleuchtungsbedingungen getroffen. Zur Anwendung kam die Beleuchtungsmethode nach KÖHLER¹⁾ in Verbindung mit einer Niedervoltlichtquelle der Firma Osram (12 V 50 W).

Da mit achromatischen Objektiven gearbeitet wurde, die besonders für den grünen Spektralbereich korrigiert sind, kam über die Kollektorlinse ein Grünfilter (Lif Panchrom). Das Absorptionsspektrum des Filters zeigt Abb. 1²⁾.

Die Frontlinse des Kondensors wurde entfernt und die Aperturblende geöffnet. Die Beleuchtungsapertur betrug somit etwa n. A. 0,5.

Als Testobjekt diente ein Leitzches Objektmikrometer, 2 mm lang, geteilt in 200 Teile. Um eine möglichst große Einstellungs- und Aufnahmepräzision zu erhalten wurden die Aufnahmen mit der Linhof-Technik gemacht³⁾.

¹⁾ Z. f. Mikroskopie 27, 477 (1910).

²⁾ Das Absorptionsspektrum wurde im Beckman Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen.

³⁾ Die Linhof Technika 6×9 wurde von den Linhof-Werken freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

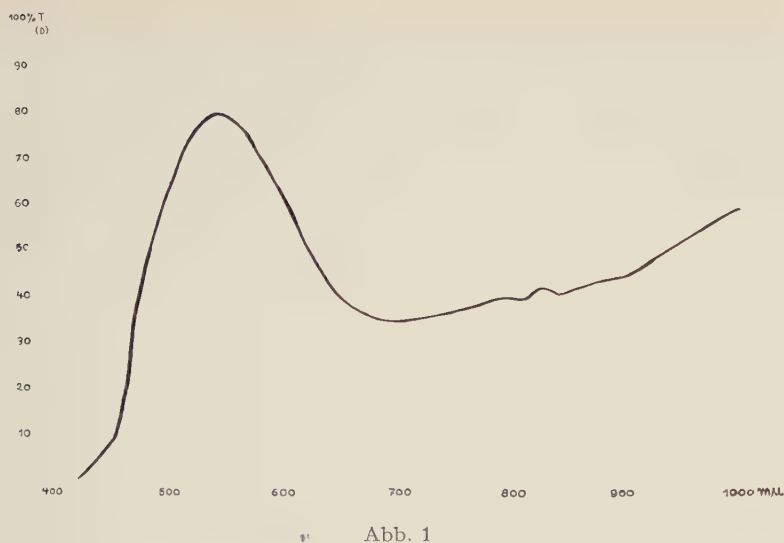


Abb. 1



Abb. 2

E. Leitz Wetzlar



Abb. 3

E. Leitz Wetzlar

Aufnahmемaterial: Die Mikrometernaufnahmen Agfa Isopan Planfilm, 6×9, die histologische Aufnahme Agfacolor-Negativfilm B II. Entwicklung des Schwarzweißmaterials in Rodinal, 1:40.

Abbildung 2 zeigt die Mikroaufnahme des Mikrometers mit Objektiv Leitz Achromat 1, n.A. 0,12 und Periplanokular 12×. Die Schärfe der Aufnahme nimmt gegen

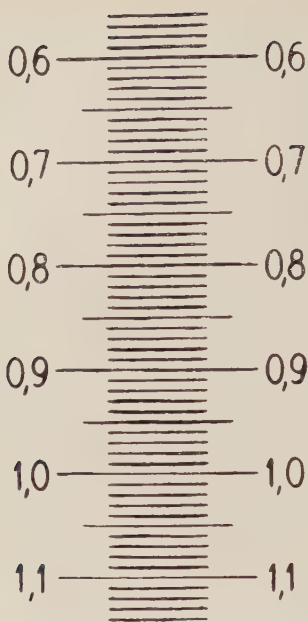


Abb. 4

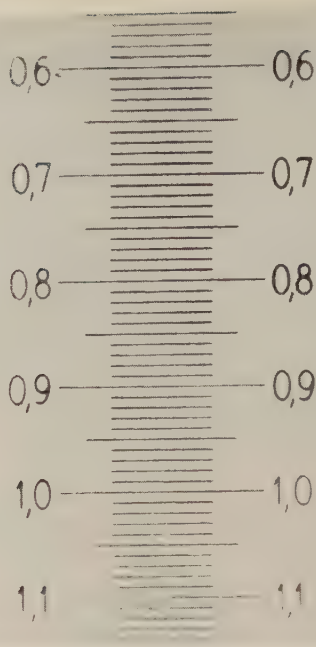


Abb. 5

den Rand des Bildes deutlich ab. Durch Verwendung eines schwächeren Okulares wäre dieser Fehler, allerdings auf Kosten der Gesamtschärfe, etwas zu verbessern.

Abbildung 3 zeigt das gleiche Objekt, aufgenommen mit Leitz Achromat 3, n.A. 0,25. Das Aufnahmeformat ist hier nicht nur völlig scharf ausgezeichnet, sondern es treten dazu noch weitere Vorteile auf:

1. Entsprechend der höheren Apertur des Objectives ist das Objekt besser aufgelöst.
2. Es geht weniger Licht verloren, benötigt wird nur etwa ein Viertel der Belichtungszeit, ein wesentlicher Faktor bei Lebendaufnahmen.
3. Je mehr Linsensysteme benutzt werden, um so flauer wird ein Bild durch Reflexion an den Linsenflächen. Daher wird ein Bild ohne Okular kontrastreicher.

Diese Eigenschaft macht sich besonders in der Mikrofotographie geltend.

Als nächstes soll gezeigt werden, welche Verhältnisse sich ergeben, wenn man den Übergang von einer Apertur zur anderen größer als bisher wählt und die Vergrößerungsdifferenz durch Weglassen des Okulars beim Objectiv höherer Apertur ausgleicht.

Abbildung 4 zeigt einen Mikrometerrausschnitt, photographiert mit Leitz Achromat 3, n.A. 0,25 und Periplanokular 12 \times . Diese Aufnahme ist randschärfer als Abb. 5, aufgenommen mit Leitz Achromat 6 L 0,65, ohne Okular.

Die Aufnahmetechnik ohne Okular käme hier also nicht in Anwendung, wenn es sich darum handeln würde, ein relativ großes ebenes Objekt in dieser Ausdehnung abzubilden. Handelt es sich aber darum, nur ein Objekt etwa der Größe bis 0,2 mm abzubilden, soll man unbedingt die Objectivapertur von etwa 0,65 ohne Okular verwenden, da die Auflösung weitaus besser ist. Als Beispiel hierzu dient Abb. 6.

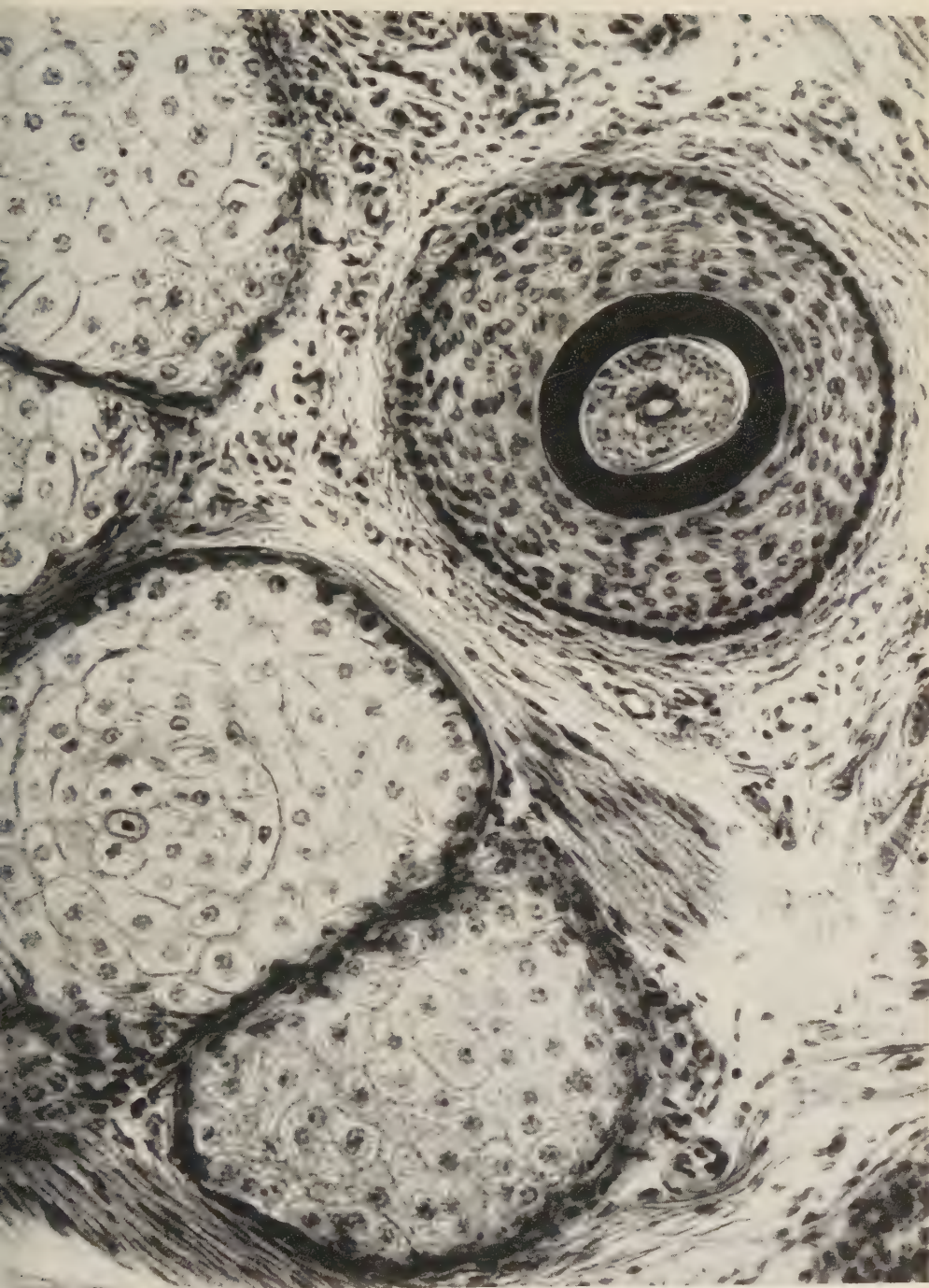


Abb. 6

Gegenüber der Kombination Objektiv 3 + Periplanokular $12\times$ kann man etwa mit der Hälfte der Belichtungszeit rechnen. Mit der n.A. von 0,65 dürfte jedoch eine Anwendung ohne Okular erschöpft sein.

Ohne Okular ist nämlich die Frontlinse dem Objekt mehr genähert als mit Okular. Über eine n.A. von 0,65 wird der Abstand so gering, daß ein Deckglas stört.

[Eingegangen am 11. November 1952]

Aus dem Pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. C. KRAUSPE) und dem Physiologisch-chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. J. KÜHNAU) der Universität Hamburg

Die Analyse von Imbibitions- und Grenzflächenphänomenen mit dem Zylinderlinsenmikroskop

Von **Jürgen Meyer-Arendt und Erica Meyer-Arendt**

Mit 6 Abbildungen

Bei einer Reihe von physikalischen Verfahren gelingt es, das histologische Präparat zu untersuchen, ohne es vorher dem schädigenden Angriff von Fixierungs- und Färbelösungen auszusetzen. Zu diesen Verfahren gehören zum Beispiel die Phasenkontrastmikroskopie und, mit gewissen Vorbehalten, die Untersuchung im infraroten, ultravioioletten und Röntgen-Licht. Schon der schwarzweiße Phasenkontrast gibt nicht nur Aufschluß über strukturelle Eigenheiten des histologischen Präparates, sondern näherungsweise auch über die optische Dichte, das Produkt aus Brechungsindex und Dicke, der Details der mikroskopischen Struktur. Je stärker die Schwärzung im Phasenkontrastbild, desto höher ist in der Regel die optische Dichte an diesem Ort.

Einen wesentlich genaueren, quantitativen Anhalt für die optische Dichte vermitteln farbige Phasenkontrast- oder auch Schlierenverfahren, wie sie z. B. vom SAILOR-BRICE-ZERNIKE, WOLTER, GRIGG und vom Verf. angegeben wurden. Aber auch diese Verfahren können insofern wiederum nur Näherungswerte für die optischen Dichten angeben, weil die Zahl der technisch ausnutzbaren Spektralfarben beschränkt und weil im histologischen Präparat gelegentlich noch eine störende Eigenfarbe enthalten ist. Wenn man allerdings auf unmittelbare Abbildung der Struktur verzichten kann, dann erhält man sehr exakte Meßwerte der optischen Dichten der Struktureinheiten mit Hilfe der von PHILPOT, LONGSWORTH, SVENSSON, WIEDEMANN u.a. beschriebenen Zylinderlinsenmethode, die bei der Elektrophorese nach TISELIUS große Bedeutung gewonnen hat. Diese und die eigentlichen Schlierenverfahren vom FOUCAULT und TOEPLER zeigen, wie auch GRASSMANN ausführte, nicht unmittelbar den Refraktionsindex an, sondern den Refraktionsgradienten, d. h. die Änderung des Brechungsindex je Längeneinheit, und damit nicht den Ort der Substratfraktion, sondern den Ort der „Schliere“.

Die Messung der optischen Dichten auf diesem Weg ist strenggenommen nur an Grenzflächen zwischen homogenen Medien möglich. Besteht nämlich das Unter-

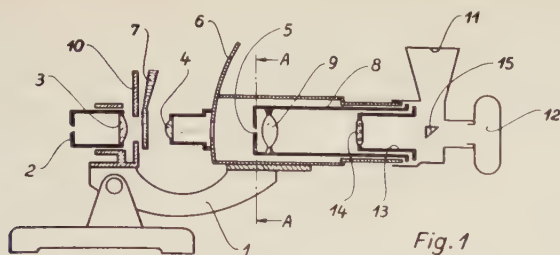


Fig. 1

Abb. 1. Schematischer Aufbau des hier benutzten Zylinderlinsenmikroskops mit PHILPOT-SVENSSON-Optik. 1 = Mikroskopstativ mit Tisch (10) und Objektivrevolver (6). 2 und 5 = fester bzw. drehbarer Spalt. 3 und 4 = achromatischer Schlierenkopf. 7 = Küvette oder Objektträger. 8 = drehbare Hülse, an Stelle eines Oculars in den Tubus eingeschoben. 9 = Objektiv zur Abbildung der Küvette auf die Photoschicht. 12 = Kleinbildkamera mit Aufsetzkamera und Mattscheibe (11) und Prisma (15). 13 = fester Innentubus mit Zylinderlinse (14). (Aus Virchows Arch. 321, 378, [1952].)

Suchungsgut auch unmittelbar an der Grenzfläche aus einem trüben Medium, dann tritt zusätzlich eine mehr oder weniger diffuse Lichtstreuung ein, die an der verminderten Helligkeit des Kurvenzuges an den zugehörigen Orten kenntlich wird. Gleiches gilt auch von einer Absorption von Strahlung im Präparat. Mit dem PHILPOT-SVENSSON-Verfahren lassen sich nun nicht nur makroskopische „Schlieren“ quantitativ darstellen, sondern ebenso auch unmittelbare Diagramme der Refraktionsgradienten von stetigen, in einer Dimension liegenden Örtern in mikroskopischen Präparaten gewinnen. Das hierzu erforderliche Gerät zeigt Abb. 1 in einer schematischen Darstellung.

Ein Beispiel möge die Anwendung des Verfahrens in der Praxis zeigen. In Abb. 2 ist das ungefärbte Schnittpräparat einer menschlichen Schilddrüse wiedergegeben.

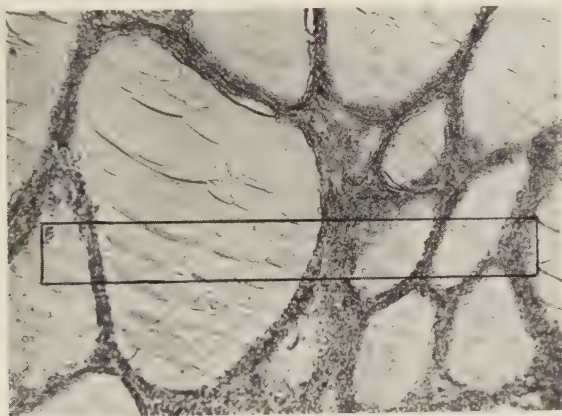


Abb. 2. Ungefärbtes histologisches Schnittpräparat eines Knotenkropfes (Struma colloidosa). Das eingezeichnete Rechteck bezeichnet das Areal, das der zylinderoptischen Analyse zugrundegelegt werden kann. Als kleinste erreichbare Fläche konnte bisher ein Areal von nur $4 \times 25 \mu$ ausgemessen werden.

Man sieht große, weite, mit Kolloid gefüllte Follikel und das mehr oder minder breite, die Follikel auskleidende Epithel. Das eingezeichnete Rechteck begrenzt das Areal, das der refraktometrischen Analyse zugrundegelegt werden kann. Das Diagramm selbst zeigt Abb. 3. Die örtliche Lagebeziehung der Refraktionsgradienten ist auf der Abszisse abzulesen, während auf der Ordinate die direkten Werte der optischen Dichte an jedem entsprechenden Ort aufgetragen zu denken sind. Außerdem vermittelt die Intensität der „Helligkeit“ der Kurve, d. h. deren Schwärzung auf dem photographischen Negativ, einen Anhalt für die bei dem jeweiligen Licht und am jeweiligen Ort eingetretene Energieabsorption.

Aus diesem Befund ergibt sich zunächst ganz allgemein, daß sich mit dieser Methode Qualitäten erfassen lassen, die schon von vornherein im mikroskopischen Präparat liegen und damit weniger der Gefahr von Fehldeutungen ausgesetzt sind, als das beispielsweise bei zahlreichen histologischen Präparations- und Färbemethoden der Fall

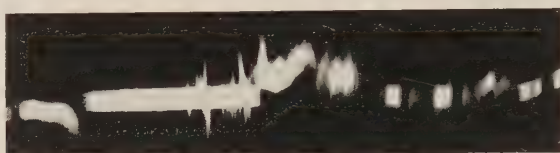


Abb. 3. Diagramm der Refraktionsgradienten in einem Areal eines ungefärbten histologischen Präparates von einer Struma colloidosa nodosa. Vgl. dazu Abb. 2. Die Abszisse in diesem Diagramm bezeichnet die örtliche Lage im Präparat; die Ordinate gibt Aufschluß über die quantitativen Werte der optischen Dichte an diesen Örtern; die Unterbrechungen des Kurvenzuges weisen auf Örtter stärkerer Absorption hin.

ist. Von einer Deutung oder gar praktischen Auswertung eines solchen Diagramms ist man allerdings noch entfernt; man kann nur aussagen, daß an bestimmten Örtern der mikroskopischen Struktur kennzeichnende Differenzen der Refraktionsgradienten vorliegen. Wir haben deshalb Modellversuche unternommen, um die zunächst sehr komplex erscheinenden Phänomene nach Möglichkeit aufzulösen.

Man kann sich zum Beispiel vorstellen, daß alle in dieser Hinsicht bedeutsamen optischen Phänomene im wesentlichen auf zwei Grundphänomene zurückgehen:

1. Da für die histologische Untersuchung das Gewebe meist in eine Flüssigkeit oder ein anderes Medium eingebettet wird, treten Imbibitions-Erscheinungen auf, d. h. optische Phänomene, die auf Differenzen optischer Eigenschaften zwischen dem eingebetteten Körper und dem Einbettungsmedium beruhen.
2. Darüber hinaus, aber in teilweiser Überschneidung, handelt es sich um Grenzflächen-Phänomene zwischen zwei Medien. Während in der Praxis meist chemische Körper eine Rolle spielen, die sich außer z. B. in ihrem Refraktionsindex auch in ihrem Aggregatzustand unterscheiden, haben wir unsere Modellversuche zur Analyse dieser Grenzflächenphänomene nur an Flüssigkeiten, und zwar vorwiegend an nicht mischbaren Flüssigkeiten, unternommen.

In der 1. Gruppe von Modellversuchen handelt es sich darum, die Erscheinungen, die sich bei der Imbibition eines festen Körpers in Flüssigkeiten verschiedener Brechzahl ergeben, schlierenoptisch zu analysieren. Es kann hier nur am Rande auf die Bedeutung der Imbibitionsverfahren, wie sie u. a. von W. J. SCHMIDT und von FAICK

und Fonoroff angegeben wurden, für die Polarisationsmikroskopie hingewiesen werden; ein ähnliches Anwendungsgebiet dürfte sich für die Phasenkontrastmikroskopie erschließen. Bei unseren Modellversuchen über Imbibitionserscheinungen ergaben sich, wie schon hier vorweggenommen sei, unmittelbare und rechnerisch leicht erfassbare Beziehungen zwischen dem Ausmaß dieser Erscheinungen und den Brechzahlen der Imbibitionsflüssigkeiten. Das war bei den später zu besprechenden Grenzflächenphänomenen nicht der Fall.

Technischer Vorgang: In den Strahlengang des Gerätes wird zwischen die beiden symmetrischen Hälften des Triplets (3, 4 in Abb. 1) eine Küvette mit einer Schichttiefe zwischen 0,1 und 1 cm gebracht und mit der Imbibitionsflüssigkeit gefüllt. In die Flüssigkeit wird der zu prüfende Körper eingetaucht, dessen Längsachse, wenn es sich um einen zylindrischen Körper handelt, waagrecht liegen soll. Wir benutzten meist einen, unten rechtwinklig umgebogenen, Glasstab von 2,5 mm \varnothing , zum Teil auch einen

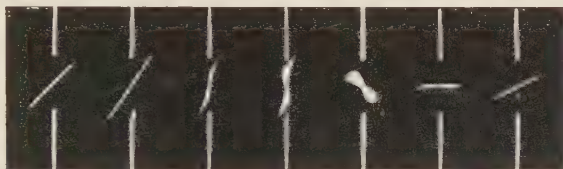


Abb. 4. Zylinderoptische Photogramme von Imbibitionsphänomenen. Glasstab jeweils in verschiedene, hier nach ihrem Brechungsindex geordnete Flüssigkeiten eingetaucht (von links nach rechts): 1. Amylalkohol; 2. Glycerin; 3. Xylol; 4. Benzol; 5. Anisol (die breite Ausziehung der Kurve beruht auf farbiger Dispersion des Lichts!); 6. Nitrobenzol; 7. Schwefelkohlenstoff. Alle Aufnahmen bei 14° Spaltneigung.

auf 0,3 mm Dicke ausgezogenen Glasfaden. Die Ergebnisse waren in beiden Fällen gleiche; nur die Intensitäten des durchgelassenen und zur Diagrammaufzeichnung führenden Lichtes waren verschieden. Wenn man die beiden Spalte 2 und 5 des Gerätes so eng zuzieht, daß eine scharfe Abbildung, aber noch keine Interferenz eintritt, dann sieht man auf der Mattscheibe Diagramme, wie sie Abb. 4 in vielfältiger Form, bei verschiedenen Imbibitionsflüssigkeiten, zeigt. Diese Diagramme lassen sich bei dem vorliegenden Gerät¹⁾ in sehr bequemer Weise photographisch festhalten. Zur quantitativen Auswertung haben wir die Diagramme mit einem Meßmikroskop beobachtet und die Neigung der Mittellinie gegen die Senkrechte, d. h. gegen die ursprüngliche Basislinie des Diagramms, mit einem Teilkreis auf $0,5^\circ$ genau gemessen. Bei gebogener Mittellinie kann man sich eine oder mehrere Tangenten, deren Neigung bestimmt wird, an die Kurve angelegt denken. Es zeigte sich sogleich, daß eine Proportionalität zwischen der Neigung der Mittellinie des Diagramms und dem Refraktionsindex der jeweiligen Imbibitionsflüssigkeit besteht. Außerdem hängt die Neigung auch von der Focussierung des Schlierenkopfes des Gerätes ab; unsere Messungen wurden selbstverständlich bei stets gleicher Einstellung vorgenommen. Drittens bestehen direkte Beziehungen zwischen der Neigung der Mittellinie und der Neigung des 2. Spaltes (5), deren graphische Darstellung, wie zu vermuten war, einen sinusförmigen Verlauf zeigte. Die folgende Tabelle gibt einige Meßwerte wieder, die wir für verschiedene Flüssigkeiten und bei vier verschiedenen Neigungen des 2. Spaltes erhalten haben.

¹⁾ E. LEITZ, Wetzlar.

Substrat	Brechzahl	Neigung des 2. Spaltes			
		7°	14°	22°	29°
Neigung der Mittellinie					
Methylalkohol	1,330	21°	38°	52°	60°
Wasser	1,333	22°	38°	51°	59°
Aceton	1,362	19°	34°	47°	56°
Äthylalkohol	1,365	18°	34°	47°	57°
Amylalkohol	1,397	18°	33°	46°	55°
Chloroform	1,446	14°	29°	41°	51°
Glycerin	1,461	16°	28°	41°	51°
Terpentinöl	1,47	11°	23°	33°	43°
Xylol	1,495	6°	12°	18°	24°
Toluol	1,496	8°	13°	19°	24°
Benzol	1,500	4°	8°	12°	15°
Anisol	1,516	—7°	—13°	—20°	—25°
Nitrobenzol	1,553	33°	54°	67°	72°
Anilin	1,584	44°	72°	81°	85°
Schwefelkohlenstoff	1,629	40°	60°	70°	75°
Schwefelkohlenstoff	1,629	35°	54°	66°	72°
Methylenjodid	1,739	33°	54°	66°	73°

(Die zwei Werte für Anisol ergeben sich aus den zwei für den Kurvenverlauf des Diagramms von Glas/Anisol möglichen Tangenten.)

Wenn man die Meßwerte bei 14° Spaltneigung aus dieser Tabelle den Brechzahlen der Flüssigkeiten zuordnet und ihr Verhältnis graphisch darstellt, dann erhält man eine Hyperbel (Abb. 5); die Ziffern aller Spalten ergeben eine Hyperbelschar. Die linken unteren Zweige dieser Hyperbeln stellen die Quotienten dar, in denen die Flüssigkeiten mit geringeren Brechungsindices enthalten sind; die rechten oberen Zweige die Quotienten mit höheren Brechungsindices. Die Neigungswinkel der zwei Tangenten, die sich an die eigenartige, in Abb. 4, 5 wiedergegebene Kurve des Diagramms von Glas/Anisol anlegen ließen, liegen bemerkenswerterweise auf der senkrechten Asymptoten, die allen Hyperbeln gemeinsam ist. Am Ort der Brechzahl von Anisol machen die mit zunehmender Brechzahl der Imbibitionsflüssigkeit sich zunächst stetig vermindernenden Meßwerte gewissermaßen einen Sprung, um sich dann als der obere rechte Zweig der Hyperbel fortzusetzen. Offensichtlich ist die Lage der senkrechten Asymptoten der Hyperbel auf der Abszisse von der Brechzahl desjenigen Körpers abhängig, der zur Imbibition gebracht wird; die Brechungsindices von Glas und Anisol stimmen auch nahezu überein. Aus einer graphischen Darstellung wie der in Abb. 5 kann man also ableiten, welchen Refraktionsindex ein eingetauchter Körper angenähert haben muß, wenn die Meßwerte an mindestens zwei Flüssigkeiten bekannt sind. Die Brechungsindices der Flüssigkeiten müssen nicht unbedingt in der Nähe der gesuchten Brechzahl des eingetauchten Körpers liegen; es leuchtet aber ein, daß das Ergebnis um so genauer wird, je näher die Brechzahlen der Meßflüssigkeiten an der des fraglichen Körpers liegen, aber auch, je größer die Differenz der Brechzahlen an sich ist und je mehr Meßflüssigkeiten für das ganze Verfahren zur Verfügung stehen.

Für die rechnerische Behandlung kann man von folgender Gleichung der Hyperbel ausgehen:

$$y = \frac{1}{x} \tag{1}$$

Die Zweige der Hyperbel liegen hierbei im 1. und 3. Quadranten des Koordinatensystems; die y- und die x-Achse sind gleichzeitig die Asymptoten der Hyperbel;

$y = x$ ist ihre große Achse. Verschiebt man nun, um eine Kurvenlage wie in Abb. 5 zu erhalten, die Zweige der Hyperbel um den Betrag n nach rechts und um den Betrag b nach oben, dann erhält man

$$y = \frac{1}{x - n} + b. \quad (2)$$

In diesem Fall sind die Koordinaten für die senkrechte Asymptote ($y = 0 \dots \infty$; $x = n$) und für die waagerechte Asymptote ($y = b$; $x = 0 \dots \infty$). Die senkrechte Asymptote der Hyperbel ist die einzige hier interessierende, die Höhenverschiebung

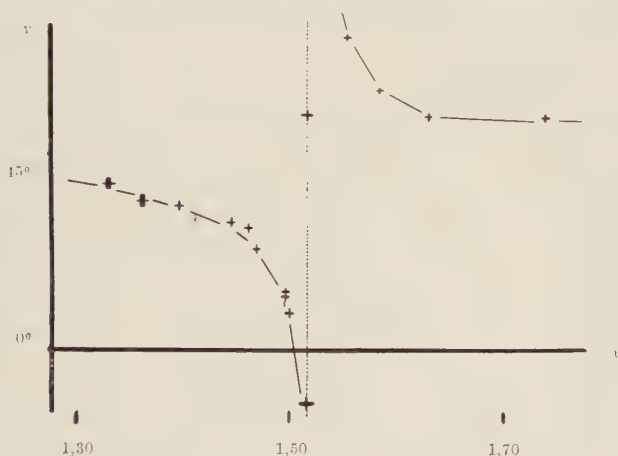


Abb. 5. Graphisch dargestellte Beziehung zwischen der Neigung der in Abb. 4 wiedergegebenen Mittellinien der Diagramme der Refraktionsgradienten zur Senkrechten und den Brechungsindizes der jeweils zugehörigen Imbibitionsflüssigkeiten. Die Funktion hat die Form einer Hyperbel; die Brechungsindizes sind auf der Abszisse, die Neigungen in Winkelgraden auf der Ordinate aufgetragen. Der linke untere Zweig der Hyperbel umfaßt die Flüssigkeiten, deren Brechzahl niedriger als die des eingetauchten Körpers ist, der rechte Zweig diejenigen, deren Brechzahl höher ist. Die senkrechte Asymptote der Hyperbel trifft die x -Achse in der Brechzahl des eingetauchten Körpers

der Kurve ist ohne Interesse. Diese senkrechte Asymptote schneidet die x -Achse in einem Punkt, der, wenn auf der Abszisse die Brechzahlen n der zur Messung benutzten Imbibitionsflüssigkeiten aufgetragen sind, unmittelbar die gesuchte Brechzahl des eingetauchten Körpers bezeichnet. Wenn nun in die Gleichung (2) für y (mindestens) zwei Meßwerte von Diagramm-Neigungswinkeln (y_1, y_2) und für x die von vornherein bekannten Brechzahlen der Flüssigkeiten (x_1, x_2) eingesetzt werden, dann läßt sich diese Gleichung leicht nach n hin auflösen. Die allgemeine Formel dafür lautet zunächst

$$y_1 = \frac{1}{x_1 - n} + b, \quad y_2 = \frac{1}{x_2 - n} + b, \quad (3)$$

wobei n den gesuchten Brechungsindex des eingetauchten Körpers bezeichnet und b , die Höhenverschiebung der Hyperbel, eliminiert wurde. Aus (3) folgt

$$n^2 - (x_1 + x_2) \cdot n = \frac{x_2 - x_1}{y_1 - y_2} - x_1 x_2 \quad (4)$$

$$\text{und weiterhin } n = \frac{x_1 - x_2}{2} \pm \sqrt{\frac{x_2 - x_1}{y_1 - y_2} - x_1 x_2 + \frac{(x_1 + x_2)^2}{4}}. \quad (5)$$

Auf diese Weise läßt sich n leicht berechnen.

Bei der 2. Gruppe der Modellversuche, die sich mit Grenzflächenerscheinungen beschäftigen, sind die Verhältnisse ganz wesentlich komplizierter und zunächst anscheinend nur empirisch zu deuten. Abb. 6 zeigt zylinderoptische Mikrophotogramme

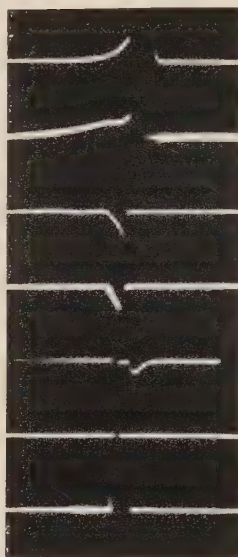


Abb. 6. Zylinderoptische Photogramme von Grenzflächen zwischen folgenden Flüssigkeiten (von oben nach unten): 1. Methylalkohol/Glycerin; 2. Methylalkohol/Schwefelkohlenstoff; 3. Toluol/Glycerin; 4. Benzol/Glycerin; 5. Amylalkohol/Wasser; 6. Benzol/Wasser; 7. Chloroform/Toluol. Alle Aufnahmen bei 7° Neigung des 2. Spaltes.

an Grenzflächen zwischen 8 verschiedenen Flüssigkeiten. Die Vermutung, die Größe der Ablenkung von der Basislinie eines Diagramms sei lediglich eine Funktion der Differenz der Brechungsindices der beiden Flüssigkeiten, ließ sich nicht bestätigen. Man findet nämlich, daß z. B. an der Grenzfläche zwischen Benzol und Wasser trotz differenter Brechungsindices überhaupt kein Gradient entsteht (Abb. 6, 6). Gleiches gilt von der Grenzfläche zwischen Anisol und Wasser. Darüber hinaus kann sogar die Richtung der Ablenkung von der Basislinie wechseln; wenn man die Ablenkung bei Methylalkohol/Glycerin, Methylalkohol/Schwefelkohlenstoff und Chloroform/Toluol als „positiv“ bezeichnen will, dann erscheint sie bei Toluol/Glycerin und Benzol/Glycerin als „negativ“. Gelegentlich, etwa zwischen Methylalkohol und Schwefelkohlenstoff und zwischen Amylalkohol und Wasser, stellt sich erst allmählich ein Gleichgewicht an der Grenzfläche ein, wie sich an photographischen Serienaufnahmen leicht nachweisen läßt. Schließlich kann man noch aussagen, daß bei nicht mischbaren Flüssigkeiten das Refraktionsdiagramm im allgemeinen unterbrochen erscheint, während bei miteinander mischbaren Flüssigkeiten statt dessen eine kontinuierliche Auslenkung des Diagramms eintritt, deren Ort der Mischungszone entspricht. Diese Verhältnisse sind ja von der Elektrophorese her gut bekannt.

Im Gegensatz zu den leicht überschaubaren Beziehungen bei der Imbibition ließen sich diese Grenzflächenphänomene rechnerisch vorerst noch nicht erfassen. Sicherlich spielen nicht etwa nur die Differenzen der Refraktionsindices der Meßflüssigkeiten eine Rolle, sondern auch die gegenseitigen Löslichkeitsverhältnisse und möglicherweise auch Adhäsionsphänomene an den Wänden der Küvette. Inzwischen fortgeführte Untersuchungen an biologischem Material zeigen, daß für eine Deutung der Befunde die leichter zu behandelnden Vorgänge bei der Imbibition ausreichend sein dürften.

Zusammenfassung

Eine schon von vornherein im biologischen Substrat liegende optische Qualität, die demnach keiner besonderen Fixierung oder Färbung bedarf, ist die optische Dichte. Hiervon abhängige Imbibitions- und Grenzflächenphänomene können mit Hilfe der von PHILPOT und SVENSSON angegebenen Zylinderlinsenoptik auch in mikroskopi-

chen Dimensionen anschaulich analysiert und bequem registriert werden. Bei biologischem Material sind die Verhältnisse sehr kompliziert. In Modellversuchen erzielte Befunde ließen sich demgegenüber rechnerisch leichter behandeln.

Schrifttum

FAICK, C. A., und B. FONOROFF: J. Opt. Soc. Am. **34**, 330 (1944). — FOUCAULT, L.: Zit. nach VIEDEMANN. — GRASSMANN, W.: Naturwiss. **38**, 200 (1951). — LONGSWORTH, L. G.: J. Am. Chem. Soc. **61**, 529 (1939); **62**, 705 (1940). — LÖWE, F.: Optische Messungen. Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1949. — MEYER-ARENDT, J.: Photographie u. Forschg. **5**, 121 (1952). — HILPOT, J. St. L.: Nature (Lond.) **141**, 283 (1938); In: BUTLER-RANDALL: Progress in Biophysics. Butterworth-Springer, London 1950. — SAILOR, Ch. P., A. T. BRICE, and F. ZERNIKE: J. Opt. Soc. Am. **40**, 329 (1950). — SCHMIDT, W. J.: In: Hdb. d. biol. Arb. methoden Abderhalden. Abt. V, Teil 10, 2. Hälfte, Bd. 4, 827. Urban u. Schwarzenberg 1938. — SVENSSON, H.: In: Adv. in Protein Chemistry IV, 251. Acad. Press., New York 1948. — TISELIUS, A.: Trans Faraday Soc. **33**, 524 (1937); Kolloid-Z. **85**, 129 (1938); **105**, 101 (1943); Naturwiss. **37**, 25 (1950). — TOEPLER, A.: Pogg. Ann. **127**, 556; **128**, 126 (1866); **131**, 33, 180 (1867); **134**, 191 (1868). — VIEDEMANN, E.: Chimia **2**, 25 (1948). — WOLTER, H.: Ann. Physik **8**, 1 (1950).

[Eingegangen am 12. November 1952]

Aus dem Anatom. Institut Göttingen (Dir. Prof. Dr. E. BLECHSCHMIDT)

Erfahrungen mit Bleitetraacetat als Oxydans für 1,2-Glykole

Von Walther Graumann

Die histochemische Anwendbarkeit von Bleitetraacetat ist neuerdings von verschiedenen Autoren geprüft worden. GLEGG, CLERMONT und LEBLOND (1952) haben jetzt ausführlicher hierüber berichtet. Auf diese Veröffentlichung sei auch bezüglich der weiteren Literatur verwiesen. Da unsere eigenen Erfahrungen mit Bleitetraacetat von denen der genannten Autoren nicht unwesentlich abweichen, soll kurz über unsere sich bereits auf einen längeren Zeitraum erstreckenden Versuche und Ergebnisse berichtet werden.

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die Tatsache der schlechten Darstellbarkeit der Knorpelgrundsubstanz mit der Perjodsäure-Leukofuchsin (PSL)-Reaktion. Dies beruht vermutlich darauf, daß in der Chondroitinschwefelsäure Amino-galaktose und Glukuronsäure durch 1,3-Glykosidbindungen verknüpft sind (MEYER und ODIER 1946, MEYER, ODIER und SIEGRIST 1948), und so die für Perjodsäure angreifbare α -Glykol-Konfiguration nicht gegeben ist. Hier hoffen wir, mit Bleitetraacetat bessere Ergebnisse erzielen zu können. Diese Verbindung besitzt eine der Perjodsäure sehr ähnliche, mit dieser aber nicht identische oxydierende Wirksamkeit gegenüber Polyalkoholen. Die Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeit cis-trans-isomerer Körper sollen ausgeprägter sein als bei Anwendung von Perjodsäure (PIGMAN-GOEPP 1948). Zusätzlich greift Bleitetraacetat α -Oxysäuren an (CRIGEE 1931).

Es ergab sich bei der Anwendung von Bleitetraacetat-Lösungen gegenüber Gewebsschnitten, daß die Wirksamkeit dieser Verbindung im Gegensatz zur Perjodsäure im starkem Maß von der Konzentration, der Art des Lösungsmittels sowie der Reaktionsdauer abhängt. Es soll hier lediglich über Versuche mit Essigsäure als Lösungsmittel berichtet werden. In 6 n Essigsäure und schwächeren Lösungen bildet sich schon beim Einbringen von Bleitetraacetat ein brauner flockiger Niederschlag durch hydrolytischen Zerfall der Verbindung. Andererseits ist bereits bei 10 n Essigsäure als Lösungsmittel der Ausfall der Reaktion wesentlich abgeschwächt. In diesen Zusammenhängen liegt die Erklärung dafür, daß GLEGG und Mitarbeiter, die reinen Eisessig als Lösungsmittel verwendeten, eine Oxydationsdauer von mehreren Stunden benötigten, um eine ausreichende Reaktion zu erzielen und daß dabei trotzdem die Erfassung von Glykogen ungenügend blieb. Bezüglich der Fehlerquellen, welche in einer prolongierten Oxydationszeit und in einer Erhöhung der Reaktionstemperatur liegen, sei auf ЛЮТКА (1952) verwiesen. Nach unseren Experimenten läßt sich bei Verwendung von 8 n Essigsäure als Lösungsmittel, wobei die oxydative Wirkung noch voll gegeben ist, andererseits eine stärkere Hydrolyse sich noch nicht bemerkbar macht, bei 15 min Reaktionsdauer eine vollständige Erfassung der Substrate erzielen.

Ebenso empfindlich reagieren die Ansätze auf Konzentrationsänderungen des Bleitetraacetat. Ansätze, welche mehr als 1% Bleitetraacetat enthalten, zersetzen sich sehr rasch unter Braunfärbung bereits während des Lösungsvorganges; andererseits sind Lösungen mit wesentlich weniger als 0,5% Bleitetraacetat nur gering wirksam. Am günstigsten erwies sich der Ansatz zur 0,5%igen Lösung. Es empfiehlt sich, die Präparate zur Oxydation einzustellen, auch wenn sich nach zehnmütigem Schütteln des verschlossenen Gefäßes noch nicht alles gelöst hat, sich aber bereits eine geringfügige Verfärbung (gelblich bis hellbraun) bemerkbar zu machen beginnt.

Technik der Bleitetraacetat-Leukofuchsin(BTL)-Reaktion

1. Fixierung: Picroformolalkohol (GENDRE, ROSSMAN).
2. Paraffineinbettung, 6 μ -Schnitte.
3. Entparaffinierung in Xylol, dann je 2 min abs. Alkohol und 8 n Essigsäure (praktisch: Eisessig-Aqu. dest. $\bar{a}\bar{a}$).
4. Oxydation 15 min: 0,5% Bleitetraacetat¹⁾ in 8 n Essigsäure.
5. Fließendes Leitungswasser 15 min, kurz Aqu. dest.
6. Nachweis der gebildeten Carbonylgruppen durch Leukofuchsin (SCHIFFSches Reagens stand. nach GRAUMANN, 1953).
7. SO₂-Bad, 3mal je 2 min.
8. Fließendes Leitungswasser 5 min.
9. Entwässerung (2mal Alk. 96%, 2mal Alk. abs.).
10. Xylol, Balsam.

Anmerkung: Die Haltbarkeit von Bleitetraacetat ist auch in Substanz begrenzt. Man sollte nach jeder Entnahme das mit Schliffstopfen versehene Vorratsgefäß paraffinieren. Die Lösung muß unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden und zersetzt sich bereits während des Versuchs. Der Preis von Bleitetraacetat ist hoch (z. Z. 55,— DM/100 g).

Es seien in der Folge die Befunde an einem 13,5 mm großen Mausfeten tabellarisch zusammengestellt, um an Beispielen die Leistungsfähigkeit der BTL-Reaktion zu demonstrieren. Es wurden jeweils benachbarte Schnitte der gleichen Serie verglichen. Geprüft wurde, ob an dem betreffenden Reaktionsort der Ausfall der Bleitetraacetat-Leukofuchsin-(BTL)-Reaktion schwächer (<) oder stärker (>) war als der der Per-

¹⁾ Bleitetraacetat der Fa. Dr. Th. SCHUCHARDT G.m.b.H., München.

dsäureleukofuchsin-(PSL)-Reaktion, beziehungsweise, ob sich bei Anwendung beider Reaktionen kein Unterschied (=) ergab. Vorausgeschickt werden muß, daß sich keine Substrate fanden, welche nur bei einer der Reaktionen positiv reagierten.

Epidermis	BTL > PSL
Basalmembranen	BTL = PSL
Corium	BTL > PSL
Muskelgewebe	BTL = PSL
Knorpelzellen	BTL = PSL
(Meckelscher Kn.)	
Knorpelgrundsubstanz	BTL > PSL
Vorknorpelblasteme	BTL > PSL
Knochengrundsubstanz	BTL > PSL
Chorda	BTL = PSL
Zahnanlage	
Pulpa- und Basalmembran	BTL > PSL
Epithel	BTL = PSL
Zentralnervensystem	BTL = PSL
Plexus chorioides	BTL > PSL
Hirnhäute	BTL = PSL
Spinalganglien	BTL = PSL
Gefäßwand (Aorta)	BTL > PSL
Oesophagus	
Epithel	BTL = PSL
Bindegewebe	BTL > PSL
Darmepithel	BTL < PSL
Leber (Megakaryocyten)	BTL = PSL
Nasenschleimhaut	BTL = PSL
Epithel des Bronchialbaumes	BTL < PSL
Lungenbindegewebe	BTL > PSL
Niere (Basalmembran)	BTL > PSL
Testis (Interstitium)	BTL > PSL
Augenanlage	BTL = PSL
Labyrinthepithel	BTL = PSL

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß in einer großen Zahl von Fällen die BTL-Reaktion hinsichtlich der Stärke des Reaktionsausfalls bessere Ergebnisse liefert als die PSL-Reaktion. Besonders gilt dies für die histochemische Erfassung der Bindegewebs- und Knorpelgrundsubstanzen, welche bei der PSL-Reaktion nur relativ schwach ansprechen. Dieses Ergebnis ist im Gegensatz zu den Befunden der oben genannten Autoren bereits bei einer Oxydationsdauer von 15 Minuten zu erreichen. Ein erheblicher Anteil der dargestellten Substrate ließ sich als Glykogen erweisen. Die genannten Autoren konnten in vierstündiger Oxydation kein Glykogen zur Darstellung bringen. Mit unserer Methode ist Glykogen in allen Fällen durch 15minütige Oxydation zur Reaktion zu bringen. In vielen Fällen entspricht der Reaktionsausfall dabei dem der PSL-Reaktion (z. B. Meckelscher Knorpel), in einigen ist die Reaktion schwächer (z. B. Bronchialepithel), vereinzelt aber auch stärker (Epidermis). Hier liegt offenbar ein Anhaltspunkt dafür vor, daß Glykogen in einem einheitlichen Körper ist (MEYER 1943, STAUDINGER 1948).

Nach den vorliegenden Ergebnissen empfiehlt es sich, bei histochemischen Kohlenhydratstudien die Oxydation von 1,2-Glykolen außer mit Perjodsäure auch mit Bleitetraacetat durchzuführen, insbesondere dann, wenn die Erfassung der Grundsubstanzen der Stützgewebe dabei von Interesse ist. Wegen der Kürze der erforderlichen Oxydationszeit und der Möglichkeit, auch Glykogen mit zu erfassen, scheint das von uns angegebene Verfahren (BTL-Reaktion) für diesen Zweck besonders geeignet zu sein.

Schrifttum

CRIEGEE, R.: Ber. dtsch. Chem. Ges. **64** B, 260 (1931). — GLEGG, R. E., Y. CLERMONT and C. I. LEBLOND: Stain Techn. **27**, 277 (1952). — GRAUMANN, W.: Z. wiss. Mikr. **61**, 225 (1953). — LHOTKA, J. F.: Anat. Rec. **112**, 422 (1952). — MEYER, K. H.: Adv. Enzymol. **3**, 109 (1943). — MEYER, K. H., und M. ODIER: Experientia **2**, 311 (1946). — MEYER, K. H., M. ODIER und A. F. SIEGRIST: Helvet. chim. Acta **31**, 1400 (1948). — STAUDINGER, HJ.: Makromol. Chem. **2**, 88 (1948). — PIGMAN, W. W., and R. M. GOEPP JR.: Chemistry of Carbohydrates, New York 1948.

[Eingegangen am 14. Januar 1953]

Aus der Anatomischen Anstalt der Freien Universität Berlin,
Direktor: Professor Dr. E. VON HERRATH

KARION „Merck“ — ein wasserlösliches Einschlußmittel in der histologischen Technik

Von H. J. Clemens

In der histologischen Technik findet Glycerin als Einschlußmittel in Form von Glycerin bidest. puriss. (DAB 6) und Glycerin-Gelatine (KAISER) für Präparate Verwendung, die vor dem Einschluß nicht mehr mit Alkohol, Xylol, Terpeneol oder ähnlichen Stoffen in Berührung kommen dürfen. Nachteilig ist, daß sich bei diesen Einschlußmethoden manche Färbungen, beispielsweise die mit Teerfarbstoffen oder Hämatoxylin, nur sehr schlecht erhalten lassen. Auch die stark hygroskopische Eigenschaft des Glycerins macht sich störend bemerkbar; durch die verhältnismäßig schnelle erfolgende Wasseraufnahme und Wasserabgabe treten Schrumpfung an den Präparaten auf. Alle Versuche, Ersatzmittel für das Glycerin zu finden (BLUNCK), die die gleichen Eigenschaften wie das Glycerin besitzen, ohne aber dessen Nachteile aufzuweisen, sind bisher fehlgeschlagen. Auch in der Industrie konnten sich die Glycerin ersatzstoffe wie Glycole, Glycolderivate, Carbitol, Cosmetol u. a. nicht recht durchsetzen. Erst in neuester Zeit findet in steigendem Maße ein Austauschstoff für Glycerin Verwendung, der Sorbit. In der makroskopischen Konservierungstechnik hat sich der Sorbitsirup, der von der Chemischen Fabrik E. Merck, Darmstadt, unter dem Namen „Karion flüssig“ Merck geliefert wird, bereits gut bewährt (CLEMENS).

Auf Grund der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Karions¹⁾ wird in der vorliegenden Arbeit dieser Stoff auf seine Verwendbarkeit in der histologischen Technik geprüft.

Material und Methode

Zur Untersuchung verwendete ich menschliches und tierisches Material, dessen Fixation mit Formol, Susa, Carnoy oder nach ROSSMANN erfolgte. Die Einbettung des Materials geschah in Paraffin oder Cremolan (SCHWARZ, W. und G. VESTER). Frisch überlebendes oder fixiertes Material wurde auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Folgende Färbemethoden wurden geprüft: Metachromatische Toluidinblaufärbung; Fettfärbungen mit Sudan III, Osmiumsäure und Ni-

¹⁾ s. CLEMENS, a. a. O.

au; Azan, van Gieson, Versilberung nach Gömöri, Hämatoxylin Ehrlich, Hämatoxilin Boehmer und Eosin. Als Einschlußmittel verwendete ich „Karion flüssig“ MERCK, Karion-Gelatine, Glycerin bidest. puriss. (DAB 6) und Glycerin-Gelatine (KAISER). Der Einschluß in „Karion flüssig“ und Glycerin reinst erfolgte nach der Einschlußmethode von ZELLER. Um Fehlerquellen bei der Beurteilung auszuschalten, wurden bei den einzelnen Verfahren die Schnitte in gleicher Dicke angefertigt und den gleichen Behandlungszeiten unterworfen.

Befunde

Die Karion-Gelatine wird wie folgt hergestellt:

7 g feinste Gelatine werden in

42 ccm Aqua dest. 2 bis 3 Stunden lang aufgeweicht.

Danach setzt man

50 ccm „Karion flüssig“ und

0,25 g Phenolkristalle (DAB 6) hinzu und erwärmt das Ganze im Wasserbad unter ständigem Rühren. Anschließend wird die Lösung heiß durch angefeuchtete Glaswolle filtriert. Man läßt die Gelatine erstarren und hält sie in einem verschlossenen Gefäß vorrätig. Konsistenz und Farbe der Karion-Gelatine sind die gleichen wie bei der Glycerin-Gelatine (KAISER). Trotz des geringen Phenolgehaltes tritt keine Schimmelbildung auf, auch nicht bei unverschlossenen Gefäßen. Auf Grund der physikalischen Eigenschaften des Karions trocknet die Karion-Gelatine wesentlich langsamer aus als die Glycerin-Gelatine. Sie verbindet Objektträger, Objekt und Deckglas mit der nötigen Festigkeit. In Alkohol trübt sich die Karion-Gelatine weißlich; Glycerin-Gelatine wird ganz weiß.

Metachromatische Toluidinblaufärbung

Menschliche Cornea (30 und 38 Jahre) wird in Carnoy fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Entparaffinierung werden die 10 μ dicken Schnitte in einer 0,001 %igen Toluidinblaulösung gefärbt (12 bis 24 Stunden). Nach der Färbung werden die Schnitte in „Karion flüssig“, Karion-Gelatine sowie vergleichsweise in Glycerin reinst und Glycerin-Gelatine (KAISER) eingeschlossen.

Beim Eindecken der Präparate in Glycerin reinst und Glycerin-Gelatine (KAISER) schlägt die metachromatische rot-rotviolette Farbe sofort in Blau um. Anders dagegen beim Einschluß im „Karion flüssig“ und Karion-Gelatine. In „Karion flüssig“ hält sich die metachromatische Färbung unverändert gut für Monate. In Karion-Gelatine bleiben zwar die Farbtöne gut erhalten, blassen jedoch nach etwa 2 bis 3 Wochen leicht ab. Beim Einschluß in Karion-Gelatine dürfen die Präparate nicht zu heiß eingedeckt werden, da sonst (bei Erhaltung der Farbtöne) etwas Farbstoff in die Gelatine gezogen wird. Unbedingte Voraussetzung zur Farberhaltung ist, daß die Präparate nach dem Färben nicht mehr in Aqua dest. oder bidest. gebracht werden, da hierdurch gleichfalls Farbumschlag nach Blau eintritt. Ebenso stellen sich Mißerfolge ein, wenn man den Phenolgehalt der Karion-Gelatine über 0,25 g erhöht. Die Färbung bleibt in Karion-Gelatine auch dann erhalten, wenn man die Deckgläser nicht umrandet und damit die Möglichkeit gegeben ist, daß die Feuchtigkeit der Luft von der Gelatine angezogen wird oder die Gelatine austrocknet. Während also Glycerin und Glycerin-Gelatine als Einschlußmittel für diese Färbemethode ungeeignet sind, stellt der Einschluß in „Karion flüssig“ nach der Einschlußmethode von ZELLER die beste bisher bekannte Methode zur Erhaltung der metachromatischen Toluidinblaufärbung dar.

Die gleichen Ergebnisse werden auch dann erzielt, wenn man sich einer anderen Fixations- und Einbettungsmethode bedient.

Beispiel: Hahnenkamm, fixiert nach Rossmann,
 Einbettung in Cremolan,
 Anfertigung der Schnitte,
 Entfernung des Cremolans in Wasser,
 Färbung mit 0,001 %igem Toluidinblau,
 Einschuß wie oben.

Da ein Differenzieren der Präparate in Aqua dest. nicht angängig ist, empfiehlt sich, die Objekte von Zeit zu Zeit zu kontrollieren, um ein Überfärben zu verhindern. Die Präparate werden eingedeckt, nachdem man die überschüssige Farbe abgesaugt hat. Farbreste machen sich bei der Verdünnung der Toluidinblaulösung von 0,001 % überhaupt nicht bemerkbar. Es handelt sich in gewisser Weise also um eine „Einschlußfärbung“. Karion (Sorbit) ist eine verhältnismäßig konstante Verbindung, die im allgemeinen nur durch stärkere Oxydationsmittel angegriffen wird. Praktisch kommt dies für die histologische Technik nicht in Betracht, da die Schnitte beim Einschluß nicht mit Stoffen wie Kaliumpermanganat, Chromsäure, Perjodsäure usw. in Berührung kommen. Zur Erhaltung der metachromatischen Färbung kommen wohl in erster Linie die physikalischen Eigenschaften des Karions in Frage. Da es wesentlich geringer hygroskopisch ist als Glycerin, kann man sich vorstellen, daß der chromotropen Micellen nur in ganz geringem Maße Wasser entzogen wird, wodurch die metachromatische Färbung erhalten bleibt. Im Gegensatz hierzu würde bei Glycerin ein starker Wasserentzug die Blaufärbung bewirken.

Fettfärbungen

Glycerin und Glycerin-Gelatine (KAISER) werden vorzugsweise als Einschlußmittel für Fettfärbungspräparate verwendet. Lediglich ROULET schreibt dem Glycerin als Einschlußmittel Nachteile zu, die in diesem Zusammenhange beachtet werden müssen:

„Mit Anilinfarben behandelte Schnitte sowie osmierte Präparate können nicht in Glycerin aufgehellt werden, weil die Färbung dann allmählich verschwindet.“

Er empfiehlt für osmierte Präparate an Stelle von Glycerin den Einschluß in Cedernöl oder Paraffin. liquid.

Sudan III (ROMEIS, §§ 1040—1045)

In Formalin fixiertes Material (hier: Mamma virgo) wird auf dem Gefriermikrotom geschnitten und in der üblichen Weise mit einer alkoholischen Sudan III-Lösung gefärbt, in 50 %igem Alkohol und Aqua dest. nachbehandelt. Die Farbe bleibt in allen Einschlußmedien gleich gut erhalten. Kombiniert man die Sudan III-Färbung mit einer Hämatoxylinkernfärbung (EHRlich), so ist diese, besonders beim Einschluß in Glycerin-Gelatine (KAISER), nur kurze Zeit (etwa 3 Wochen) unverändert haltbar. Die Kernfärbung blaßt ab, während sich die Sudan III-Färbung wie oben verhält. Beim Einschluß in Karion und Karion-Gelatine wird die Kernfärbung nur unwesentlich angegriffen (Beobachtungszeit: 4 Monate).

Osmiumtetroxyd (ROMEIS, §§ 1053—1063)

Deckt man mit Osmiumsäure geschwärzte Präparate (hier: Gefrierschnitte, Mamma virgo, Formolfixation), die unter gleichen Bedingungen hergestellt worden sind, in Karion, Karion-Gelatine, Glycerin und Glycerin-Gelatine (KAISER) ein, so zeigen sich bei vergleichenden Untersuchungen sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Schwärzung keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Einschlußmitteln.

in Abblässen der Farbe, wie es ROULET für osmierte Präparate beim Einschluß in Glycerin angegeben hat, kann ich nach einer bisherigen Beobachtungszeit von acht Monaten nicht feststellen.

Nilblau

An Stelle von Nilblausulfat, welches nicht zu beziehen war, verwendete ich Nilblau MERCK). Die färberischen Resultate (hier: Gefrierschnitte, Mamma virgo, Formolfixation) sind die gleichen. Die Färbung erfolgt nach dem von ROMEIS (§§ 1064—1067) angegebenen Verfahren. Während sich die Fettfärbung in allen Einschlußmedien gleich verhält, blaßt die Kernfärbung beim Einschluß in Glycerin und Glycerin-Gelatine nach mehreren Wochen etwas ab, in Karion und Karion-Gelatine dagegen nicht.

Hämatoxylinfärbung

Über den Einschluß der Hämatoxylinfärbungspräparate in Glycerin bzw. Glycerin-Gelatine (KAISER) schreibt ROMEIS:

„ (§ 802) Nachteilig ist, daß sich sehr viele Färbungen, auch die Hämatoxylinfärbungen, in Glycerin (gemeint ist Glycerin) nur schlecht halten. . . (§ 807) Ein großer Nachteil der Karbolglycerin-Gelatine ist, daß die Kernfärbung mit Hämatoxylin in ihr sehr bald zerstört wird. Um diesen auf den Säuregehalt des Einbettungsmittels beruhenden Nachteil zu vermeiden, empfiehlt W. GROSS eine von LOHAUS mit Boratpufferzusatz zubereitete Glyzeringelatine. . . Leider bleibt die Kernfärbung mit Hämatoxylin auf die Dauer auch in gepufferter Glyzeringelatine nicht erhalten.“

Die von mir durchgeführten Versuche bestätigen diese Einwände. So zeigt sich hier: Kalbsschnauze, Formolfixation, Paraffinschnitt), daß sich die Präparate besonders schlecht in Glycerin-Gelatine erhalten lassen. Dabei spielt es keine Rolle, welches Hämatoxylin man verwendet. Auch in Glycerin blaßt die Kernfärbung mit Hämatoxylin ab. Wie verhalten sich nun die Hämatoxyline beim Einschluß in „Karion flüssig“ oder Karion-Gelatine? Im Vergleich zu Balsampräparaten tritt auch in diesen Einschlußmedien eine leichte Abblässung der Kernfärbung ein, jedoch wesentlich geringer und langsamer als in Glycerin oder Glycerin-Gelatine. ROMEIS macht für das Abblässen der Hämatoxylinfärbung den Phenolgehalt der KAISERSchen Gelatine verantwortlich. Ich glaube, daß daneben auch noch das Lösungsvermögen der Hämatoxyline eine Rolle spielt, da sich ja die Kernfärbung auch beim Einschluß in Glycerin reinst verändert. Hämatoxylin ist in Glycerin stärker löslich als in „Karion flüssig“.

Häufig wird neben der Hämatoxylinkernfärbung eine Bindegewebsfärbung mit Eosin angewendet. Beim Einschluß der Eosinfärbungspräparate zeigt sich, daß dieser Farbstoff schon makroskopisch sichtbar aus den Schnitten herausgezogen wird. Am stärksten tritt dies bei der Glycerin-Gelatine ein, während es beim Einschluß in „Karion flüssig“ nicht beobachtet wird. Eigenartigerweise zeigen sich bei der Kombination von Hämatoxylin- und Eosinfärbungen Unterschiede in den Färbungsergebnissen, je nachdem, ob man wasserlösliches oder alkohollösliches Eosin mit der Hämatoxylinkernfärbung verbindet. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung bleibt am besten in Karion-Gelatine erhalten. Hier werden fast die gleichen Ergebnisse erzielt wie beim Einschluß in Kanadabalsam. Bei Verwendung des EHRLICHschen Hämatoxylins gibt die Zweifachfärbung mit wasserlöslichem Eosin die färberisch besten Resultate, während bei Anwendung des Hämatoxylins BOEHMER das alkohollösliche Eosin besser erhalten wird als das wasserlösliche. Die Kernfärbung selbst verhält sich wie oben geschildert. In „Karion flüssig“ bleibt die Kernfärbung besser erhalten als in Glycerin reinst; beide Einschlußmedien greifen die Eosinfärbung stark an. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verhält sich in den flüssigen Einschlußmedien in bezug auf das alkohol- bzw. wasserlösliche Eosin umgekehrt wie bei den Gelatinen.

Bei der Prüfung weiterer Färbemethoden an Präparaten, die mit Karion, Karion-Gelatine, Glycerin und Glycerin-Gelatine (KAISER) eingedeckt werden, ergeben sich nachstehende Befunde:

Azanfärbung, (ROMEIS, § 1489)

Spätestens nach zwei Wochen wird die Azanfärbung (hier: Froschdarm, Susafixation, Paraffinschnitte) in Glycerin und Glycerin-Gelatine völlig zerstört, und zwar in Glycerin-Gelatine schneller als in Glycerin. Auch in Karion-Gelatine wird die Azanfärbung stark angegriffen (Blaufärbung stärker als Rotfärbung). In „Karion flüssig“ blaßt die Farbe bei Erhaltung der Farbtöne ebenfalls ab. Zum Einschluß der mit Azan gefärbten Präparate sind daher die genannten Stoffe ungeeignet.

van Gieson-Färbung (ROMEIS, § 708)

Das Abblassen der Färbung, wie es vom Einschluß der nach VAN GIESON gefärbten Präparate (hier: Papillarmuskel vom Kalb, Susafixation, Paraffinschnitte) in Kanadabalsam bekannt ist, läßt sich auch durch den Einschluß in Karion und Glycerin sowie den entsprechenden Gelatinen nicht verhindern. Es verblaßt in erster Linie die Säurefuchsinfärbung, was einmal auf den schädlichen Einfluß der Pikrinsäure auf das Säurefuchsin, zum anderen auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß Säurefuchsin im Wasser — bei den verwendeten Einschlußmitteln handelt es sich um wäßrige Lösungen — sehr stark angegriffen wird. Mit der Zeit blassen auch Kern- und Muskelfärbung ab. Der Einschluß in Balsam ist daher immer vorzuziehen.

Versilberung nach GÖMÖRI (ROMEIS, §§ 1533—1535)

Die nach GÖMÖRI versilberten Präparate (hier: Blutgefäße, Formolfixation, Paraffinschnitte) können, ohne verändert zu werden, mit den beschriebenen Einschlußmitteln behandelt werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Stoffen treten nicht auf.

Beim Einschluß in Glycerin treten nicht selten Schrumpfungen auf, die man durch stufenweises Übertragen in ein Wasser-Glycerin-Gemisch zu vermeiden sucht. Handelt es sich um fixiertes Material, so ist eine derartige Maßnahme beim Einschluß in Karion in keinem Falle erforderlich. Lediglich frisches unfixiertes Material (hier: Cornea, frisch überlebend, 24 Stunden in „Karion flüssig“ bzw. Glycerin) zeigt eine geringe Schrumpfung nach Karion-Behandlung, die aber ganz erheblich geringer ist als nach der Glycerin-Behandlung. Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen von KWOCZEK und v. MOERS-MESSMER bestätigt.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß „Karion flüssig“ (Sorbit sirup) bzw. Karion-Gelatine (CLEMENS) ein gleichwertiger Austauschstoff für die bisher verwendeten Einschlußmedien Glycerin und Glycerin-Gelatine (KAISER) ist. Die Vorzüge der Karionanwendung in der histologischen Technik sind folgende:

1. Der Einschluß in „Karion flüssig“ nach der Einschlußmethode von ZELLER stellt die bisher beste Methode zur Erhaltung der metachromatischen Toluidinblaufärbung dar.

2. Die Fettfärbungen (Sudan III, Osmiumtetroxyd, Nilblau) verhalten sich in allen Einschlußmedien (Karion-flüssig, Karion-Gelatine, Glycerin, puriss. bidest., Glycerin-Gelatine) gleich. Die Kernfärbung von mit Nilblau gefärbten Präparaten wird durch „Karion flüssig“ bzw. Karion-Gelatine besser erhalten.

3. Die Hämatoxylinkernfärbungen blassen auch in „Karion flüssig“ bzw. Karion-gelatine etwas ab, jedoch wesentlich langsamer als in Glycerin bzw. Glycerin-Gelatine. Für den Einschluß der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen eignet sich vor allem die Karion-Gelatine.

4. Beim Einschluß in „Karion flüssig“ treten bei unfixiertem Material ganz geringe Schrumpfungen auf, während bei fixiertem Material keinerlei Schrumpfung feststellen ist.

Schrifttum

BLUNCK, G.: Verwendung des Glycerinersatzmittels „Glyzinal“ in der Mikroskopie. Z. w. M. **35**, 49—251 (1918). — CLEMENS, H. J.: KARION „MERCK“ als Austauschmittel für Glycerin in der makroskopischen Konservierungstechnik. Anat. Anz. Del. 99, H. 18/19, 322—327, 1953. — JANISTYN, H.: Riechstoffe, Seifen, Kosmetika **1**, 367 (1950). Verlag Dr. A. Hüthig, Heidelberg. — JANISTYN, H.: Sorbit in der Kosmetik. Parfümerie und Kosmetik, 31. Jahrg. **3**, 77—80 (1950). — KAISER, E.: Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glyzeringelatine. Biol. Zbl. **1**, 25. — KWOCZEK, J. und W. v. MOERS-MESSMER: Dermatologische Studie über Sorbit. Z. f. Haut- und Geschlechtskrankheiten **12**, 9. — MERCK, E.: (Chemische Fabrik Darmstadt) Karion „Merck“. — NEUWALD, F.: Sorbit in der Pharmazie. Pharmaz. Zeitung, Nachr. Nr. 4, 1952. — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. 15. Aufl., München 1948, Leibniz-Verlag. — ROULET, F.: Methoden der pathologischen Anatomie. Wien, Springer-Verlag 1948. — SCHWARZ, W., und G. VESTER: Cremolan, ein wasserlösliches Einbettungsmittel für histologische und elektronenmikroskopische Schnittpräparate. Z. w. M. (im Druck). — ZELLER, H.: Der Einschluß in Glycerin. Z. w. M. **58**, 314—320 (1941/42)

[Eingegangen am 21. Januar 1953]

Kleine Original-Mitteilungen

Moller, Walter. (Aus der Mikrotechnischen Abteilung der Optischen Werke J. D. Möller G.m.b.H., Wedel i. Holst.) Die „Miproleuchte“, eine Lichtquelle für Projektionsmikroskopie. Mit 3 Abbildungen im Text. — Eingegangen am 17. X. 1952.

Voraussetzung für eine fruchtbare Diskussion eines Präparates ist, daß das mikroskopische Bild den Interessierten objektiv vor Augen steht. Diese Forderung wird am einfachsten und am besten durch die Projektion des Originalpräparates erfüllt. Im Hörsaal ist daher der Mikroprojektor längst unentbehrlich. Projektionsmikroskopie läßt sich mit gleichem Vorteil auch im Kursraum und im Arbeitszimmer anwenden, wenn ein normales Mikroskop mit einer geeigneten Lichtquelle benutzt wird.

Die „Miproleuchte“, eine für diesen Zweck entwickelte Mikroprojektionsleuchte, wird wie eine normale Mikroskopierlampe gebraucht. Sie ist ausgerüstet mit einem dreilinsigen Kondensor, der so berechnet ist, daß er zusammen mit dem Mikroskopkondensor ein Beleuchtungssystem für Mikroprojektion bildet. Als Lichtquelle dient die Philips-Mikroprojektionslampe 6019 M (8 Volt, 6 Amp.), die für die Miproleuchte zentriert in einem Spezialsockel geliefert wird. Die entsprechende Fassung in der Leuchte ist fabrikseitig genau einjustiert. Durch diese Maßnahmen wurde erreicht, daß die Glühwendel jeder Lampe zwangsläufig in der optischen Achse liegt. Es entfällt daher die für den Benutzer umständliche und zeitraubende Justierarbeit.

Im Fuß der Miproleuchte ist der Transformator zum Anschluß an das Wechselstromnetz eingebaut. Außerdem enthält der Fuß den Schalter und die Helligkeitsregelung für die verschiedenen Verwendungszwecke. Die Regulierung der Helligkeit erfolgt bei Type A in 4 Stufen (4, 6, 8, 8,5 Volt), bei der in Abb. 1 wiedergegebenen Type B über den gleichen Bereich kontinuierlich durch Drehwiderstand und Meßinstrument. In ihrer Leistung sind beide Typen gleich. Die Type B empfiehlt sich, wenn man mit Schwankungen im Lichtnetz zu rechnen hat oder wenn man — etwa für Mikrophotographie — konstante und jederzeit reproduzierbare Lichtverhältnisse zu haben wünscht.

Die Einstellung der Miproleuchte ist wegen ihrer starren Achse denkbar einfach. Zur einmalig vorzunehmenden Anpassung an das Mikroskop wird der Leuchtenkondensor in seinem Gewinde so eingestellt, daß die Lampenwendel entsprechend dem KÖHLERSchen Beleuchtungsprinzip in der Ebene der Irisblende des Mikroskops abgebildet wird. Für jede spätere Benutzung ist es lediglich erforderlich, die Achse des Mikroskops mit der Achse der Leuchte im Mikroskopspiegel zum Schnitt zu bringen, mit anderen Worten: Man stellt das Mikroskop so vor die Miproleuchte, daß das Licht auf die Spiegelmitte fällt.

Der Beleuchtungsapparat des Mikroskops wird bei Projektionsmikroskopie in der gleichen Weise gebraucht wie bei Mikrophotographie, d.h. Objektive bis etwa zur num. Apertur 0,50 werden nur mit der Hinterlinse des üblichen Kondensors (n. A. 1,20), Objektive höherer Apertur, einschließlich der Immersion, mit vollem, ungetrenntem Mikroskopkondensor benutzt. Die beste Schirmbildhelligkeit für die einzelnen Objektive läßt sich dann durch die Höhenverstellung des Kondensors bequem einstellen.

Da die Projektionsentfernung eine zusätzliche Vergrößerung mit sich bringt, bevorzugt man bei Projektionsmikroskopie schwache Okulare. Das Okular 6× liefert bei

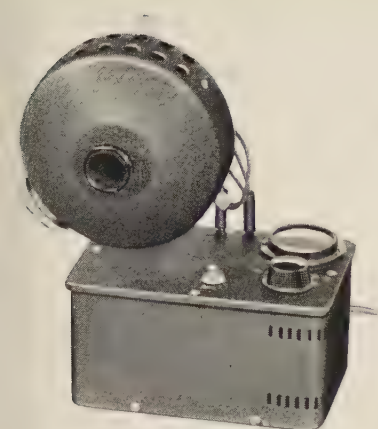


Abb. 1. Miproleuchte, Type B. Projektionslichtquelle mit kontinuierlicher Regelung der Helligkeit. — Werkbild: J. D. MÖLLER

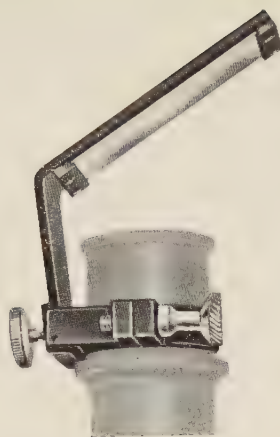


Abb. 2. Umlenkspiegel zur Projektion und zum Zeichnen mikroskopischer Präparate. Werkbild: J. D. MÖLLER

einer Projektionsweite von etwa 2 m ein Schirmbild von 1 m Durchmesser. Bei Vorführungen vor einem kleinen Kreise sind so große Bilder meist gar nicht erforderlich. Begnügt man sich mit kleineren Durchmessern, so kann man auf völlige Raumverdunkelung in der Regel verzichten.

Um das Projektionsbild, das an der Zimmerdecke erscheinen würde, in einer für die Betrachtung bequemerer Stellung an der Wand oder auf der Tischfläche aufzufangen, benutzt man einen Umlenkspiegel (Abb. 2), der am Okularstutzen des Mikroskops befestigt wird. Der Umlenkspiegel in der Ausführung der Optischen Werke J. D. MÖLLER besitzt einen durch eine Stellschraube zwischen 20° und 50° verstellbaren Spiegelträger mit aufgedampftem Oberflächenspiegel. Dieser Präzisionspiegel verleiht hohe Reflexion und große Wischfestigkeit mit einer ausgezeichneten Bildwiedergabe, da keine störenden, Unschärfe vortäuschenden Doppelbilder auftreten. Die Verschwenkbarkeit des Spiegelträgers erlaubt nicht nur eine bequeme Höheneinstellung des Schirmbildes bei Wandprojektion, sondern gestattet auch mit geneigtem Stativ die Projektion auf die Tischfläche (Abb. 3).

Diese Projektionslage, bei der eine Verdunkelung entbehrlich ist, bietet Vorteile bei der Demonstration insofern, als sich Hinweisstriche, erklärende Beschriftungen usw.

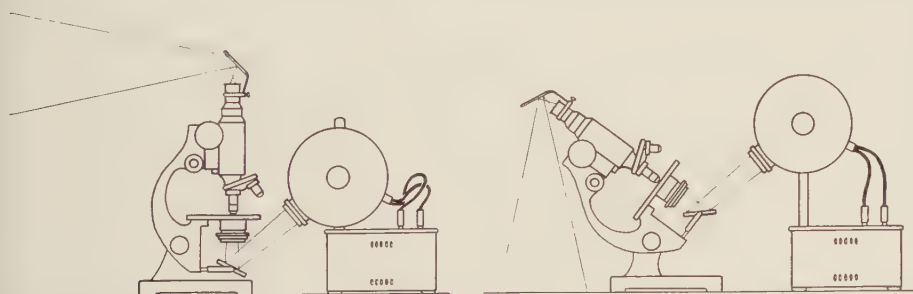


Abb. 3. Wand- und Tischprojektion mit Miproleuchte und Umlenkspiegel unter Benutzung eines normalen Mikroskops. — Werkbild: J. D. MÖLLER

unmittelbar am Projektionsbild anbringen lassen. Sie eignet sich daher besonders zur Vorführung fest eingestellter Präparate im Kurs.

Die Tischprojektion ermöglicht weiterhin ein müheloses Zeichnen mikroskopischer Objekte, da das Bild beidäugig und aus normaler Sehweite betrachtet wird. Um eine völlig unverzerrte Bildwiedergabe zu erzielen, wird der Spiegelträger vermittle der Einstellschraube so eingestellt, daß das Gesichtsfeld als Kreisfläche erscheint. Durch eine Breiten- und Längenmessung läßt sich das schnell und einfach kontrollieren. Sollen in die Zeichnung feinste Einzelheiten eingetragen werden, die bei geringer Verdunkelung im Projektionsbild vielleicht nicht klar genug erscheinen, so läßt sich der Spiegelträger zurückklappen und gibt das Okular für direkte Beobachtung frei, ohne daß dadurch die eingestellte Spiegelneigung beeinflusst wird. Selbstverständlich ist für solche Zwischenbeobachtungen die Helligkeit der Lampe herabzusetzen und das Mikroskop mit Blauscheibe zu benutzen. Ist der gewünschte Aufschluß gefunden, so kann nach Vorklappen des Spiegelträgers die Zeichnung unmittelbar fortgesetzt werden.

Als Auffangfläche bietet sich für Tischprojektion weißes Papier oder Zeichenkarton von selbst an. Aber auch für Wandprojektion sind diese Materialien durchaus zu empfehlen. Da bei Projektionsmikroskopie das Bild aus verhältnismäßig kurzer Entfernung betrachtet wird, muß die Projektionsfläche glatt sein. Strukturen auf dem Bildschirm wirken störend und vermindern zudem das Auflösungsvermögen der Objektive. Sehr geeignet ist eine mit Barytpapier bespannte Sperrholz- oder Hartfaserplatte im Format 1×1 m.

Wenn auch bei der Konstruktion der Miproleuchte die Verwendung als Projektionslichtquelle im Vordergrund stand, so läßt sich die Leuchte natürlich auch für andere Zwecke der Mikroskopie ohne Einschränkung benutzen. Von besonderem Vorteil ist dabei die Wählbarkeit der Lampenspannung.

Als normale Mikroskopierlampe gestattet die Miproleuchte die Durchführung der KÖHLERSchen Beleuchtung. Für Arbeiten im Hellfeld genügt dabei eine Lampenspannung von 4 bis 6 Volt. Zur Dunkelfeldbeleuchtung benutzt man die große Helligkeit der Miproleuchte mit Spannungen von 6 bis 8 Volt aus. Zur Mikrophotographie stellt man die Lampe im allgemeinen auf Normalspannung (8 Volt) oder paßt die Helligkeit dem Objekt an. Bei beweglichen Objekten kann eine Überspannung (8,5 Volt) zur Verkürzung der Belichtungszeit vorteilhaft sein. Daß die an ihrer Säule verstellbare und verschwenkbare Lampe auch zur direkten Auflichtbeleuchtung und als Lichtquelle für Opakilluminatoren dienen kann, braucht nicht hervor gehoben werden.

Die Miproleuchte ist also im Grunde eine universell verwendbare Mikroskopierlampe. Durch ihre zusätzliche Verwendung als Projektionslichtquelle bietet sie neue Einsatzmöglichkeiten sowohl im Unterricht wie in der Forschung.

[Eingegangen am 17. Oktober 1952]

Referate

Loub, W., Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe (Sitz.-Ber. Österr. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, Bd. **160**, Heft 10, S. 829—866 mit 4 Textabb.).

Verf. untersucht die Giftwirkung zahlreicher Farbstoffe auf Desmidiaceen und Grünalgen. Besonders empfindlich waren *Netrium*, *Cylindrocystis* und *Closterium*, besonders resistent *Scenedesmus*, *Pediastrum*, *Staurastrum*. Verf. stellt die geprüften Farbstoffe nach absteigender Giftigkeit in folgende Reihen:

- a) basische Farbstoffe: Methylviolett, Gentianaviolett, Chrysoidin, Malachitgrün, Brillantgrün, Janusgrün, Methylgrün, Vesuvium, Brillantkresylblau;
- b) saure Farbstoffe: Erythrosin, Alizarinorange, Eosin, Fluoreszin, Tropäolin OO, Orange G, Nigrosin, Zyanol, Methylorange, Anilinblau.

Küster (Gießen)

Weber, F., Kenda, G. u. Thaler, J., Viruskörper in Kakteenzellen (Protopl. 1952, Bd. **41**, Heft 3, S. 277—286 mit 7 Textabb.).

In den Zellen der Blüten von *Rhipsalis* finden die Verf. spindelförmige doppelbrechende Viruskörper, daneben kugelförmige protoplasmatische x-bodies, die den von Epidermiszellen des *Solanum nudiflorum* bekannten ähnlich sind, das von Aucuba-Mosaik-Virus befallen ist. Auch bei *Rhipsalis* sieht der Zellkern aus dem x-body heraus. Einschlußkörper vom Zellkern zu differenzieren, wurde mit Methylgrün und Pyronin versucht: Fixierung mit absolutem alkoholhaltigen Fixierungsmittel läßt allerdings die Spindel verschwinden; die Verf. fixierten daher mit Sublimatalkohol oder mit Chrom-Osmium-Essigsäure (FLEMMING). Nach Auswaschen erhält man bei Färbung mit Unnas Farbstoffgemisch Spindeln und x-bodies rot gefärbt; der Zellkern färbt sich grün. Nicht immer gelingt allerdings diese Differenzierung. Die Färbung spricht vielleicht dafür, daß die Spindeln und der plasmatische Einschlußkörper Ribonukleinsäure enthalten; allerdings erfolgte die Färbung auch nach vorangehender Salzsäurehydrolyse bzw. Vorbehandlung mit Trichloressigsäure.

Küster (Gießen)

Fritz, A., Veränderungen von Plasmaeigenschaften durch Vitalfarbstoffe. I. Prune pure (Sitz.-Ber. Österr. Akad. d. Wiss. math.-naturw. Kl. Abt. I, Bd. **160**, Heft 10, S. 789—828).

Mit Prune pure färben sich Plasma und Zellkerne bei manchen Objekten (innere Zwiebschuppenepidermis von *Allium cepa*, Stengelepidermen von *Vicia* und *Tradescantia*) stets; bei anderen Objekten tritt die Färbung häufig ein (äußere Schuppen von *Allium*, Stengelepidermis von *Eranthis*); Plasmafärbung wird bei *Taraxacum* erzielt, Leukoplastenfärbung bei *Tradescantia*, diffuse Vakuolenfärbung bei Außenepidermis von *Allium*, bei *Vicia*, *Daucus*, *Tradescantia*, *Eranthis* und *Taraxacum*. Die Membranen färbten sich an den Schnittträgern bei *Tradescantia* und *Eranthis* und an den toten Zellen von *Daucus*. Bei längerem Sauerstoffabschluß verschwindet namentlich im Schnittinneren größerer Gewebeschnitte die Blaufärbung und macht einer blassen Gelbfärbung Platz; bei Sauerstoffzufuhr tritt wieder die ursprüngliche Färbung ein.

Prune pure wirkt sehr wenig schädigend; vollständig auswaschbar ist die Hellfeldfärbung von Plasma und Zellkern (Innen- und Außenepidermis); an den Zellen der Innenepidermis fällt beim längeren Wässern eine leichte Färbung der vorher farblosen Vakuolen auf. An anderen Objekten ist die Hellfeldfärbung von Plasma und Kern ebensowenig wie die Vakuolenfärbung durch Wässern auswaschbar. Gefärbte und hiernach gewässerte Schnitte leben länger als die in der Farblösung verbliebenen, aber kürzer als die gewässerten ungefärbten Kontrollen; durch Prune pure-Färbung wird bei den beiden Epidermen von *Allium*, bei *Vicia*, *Daucus* und *Eranthis* die Viskosität des Plasmas vermindert, bei *Tradescantia* erhöht; die Permeabilität für Harnstoff wie für Glycerin wurde durch die Färbung bei allen Objekten gehemmt, die Hitze-resistenz nicht beeinflußt.

Im ultravioletten Licht fluoresziert das Protoplasma der *Allium*epidermen in den im Hellfeld mehr oder weniger entfärbten Teilen außerordentlich grell gelbgrün; die Kerne werden als dunkle ausgesparte Stellen sichtbar. Die unter Verlust der Hellfeldfärbung bei Luftabschluß erzielte Fluoreszenz war besonders intensiv; nach erneuter Zuführung von Sauerstoff geht die Fluoreszenz wieder auf den ursprünglichen Grad zurück. Das Protoplasma setzt seine Strömung nach solchen Färbungen lebhaft fort. Die Fluoreszenzfärbung des Plasmas (*Allium*epidermen) läßt sich durch Wasser nicht auswaschen.

Küster (Gießen)

Buchwald, E., Einführung in die Kristalloptik. 4. verb. Auflage mit 121 Figuren. Berlin 1952 (Walter de Gruyter & Co.). Sammlung Götschen Band 619. Preis DM 2,40.

Das bewährte Werkchen liegt in einer neuen Auflage vor mit den Vorzügen, die es seit langem aufweist und die sich nicht besser kennzeichnen lassen als mit den Worten des Verf., daß man zwar von den Grundgleichungen der elektromagnetischen Lichttheorie ausgehen und sie auf den Fall der anisotropen Körper spezialisieren könnte, daß aber geschichtliches Verständnis und Anschaulichkeit verloren gingen, wenn man die Kristalloptik anschaulich, formschön und farbenfreudig rein deduktiv behandeln wollte. Steht daher die klassische Kristalloptik in ihrer historischen Entwicklung im Vordergrund, so findet doch auch die elektromagnetische Lichttheorie und die Gitteroptik an geeigneter Stelle eine kurze Behandlung. Auch manche interessante experimentelle Einzelheiten sind in den Text eingeflochten. Es wäre erwünscht, wenn in einer künftigen Auflage auch neuere Kompensatorformen (z. B. nach BEREK) erwähnt würden, da sie, wenigstens im Bereich mikroskopischer Untersuchungen, den Babinet-Kompensator so gut wie ganz verdrängt haben. Das Büchlein ist sehr zu empfehlen und preiswert.

W. J. Schmidt (Gießen)

Kosmos Lexikon der Naturwissenschaften mit besonderer Berücksichtigung der Biologie. Stuttgart (Franckhsche Verlagshandlung) 1952. Lieferungen 3—7, Preis je DM 2,50.

Auch die weiter erschienenen Lieferungen 3—7 bestätigen den guten Eindruck der vorausgegangenen; besonders erwähnenswert ist eine schöne Farbentafel betreffend Edelsteine.

W. J. Schmidt (Gießen)

Annual Report of the Board of Regents of The Smithsonian Institution showing the Operations, Expenditures, and Condition of The Institution for the Year Ended June 30, 1950 Washington (United States Government Printing Office). 1951. 3 Dollar.

Der bekannte Bericht enthält neben dem umfassenden Report des Sekretärs über die Leistungen der Smithsonian Institution eine Reihe von Aufsätzen allgemein wissenschaftlichen Charakters, die auch für den Naturforscher von Interesse sind.

W. J. Schmidt (Gießen)

Charles, W. B., Frazier, W. C., Wilson, J. B., Knight, S. G., Microbiology General and Applied, New York (Harper and Brothers) 1951. XI u. 493 Seiten mit 70 Abb. 5 Dollar.

Das von vier Dozenten des Bakteriologischen Institutes der Universität Wisconsin erfaßte Buch, das aus mimeographischer Vervielfältigung der Niederschrift von Vorlesungen an dieser Universität hervorging, wendet sich in erster Linie an den Studenten und zwar nicht den künftigen Mikrobiologen, sondern an alle, die irgendwie mit diesem Gebiete in Berührung kommen. Es umfaßt die Mikrobiologie nach der theoretischen und angewandten Seite in weitestem Umfang. Zunächst wird die Morphologie der Mikroorganismen geschildert, dann ihre Physiologie; darauf folgen die Laboratoriumsmethoden, und weitere Teile sind der angewandten Mikrobiologie gewidmet: industrielle Mikrobiologie, Mikrobiologie des Bodens, der Luft, des Wassers, der Abwässer, der Nahrungsmittel, infektiöse Mikroorganismen von Tier und Pflanze. Ein schlußabschnitt betrifft die Geschichte der Mikrobiologie und im Anhang wird die Klassifikation der Mikroorganismen im allgemeinen und der Bakterien und Hefen im besonderen gegeben. Die Darstellung ist sorgfältig gegliedert, knapp, klar und fesselnd, mit gut gewählten Abbildungen versehen, die fast ausschließlich Photographien sind, darunter viele Mikroaufnahmen auch im Phasenkontrast und elektronenoptische. Jedem Kapitel ist eine Liste der wichtigsten neueren Literatur angehängt, die allerdings nur das amerikanische Schrifttum berücksichtigt. So ist ein schönes und nützlich Werk entstanden, das Theorie und Anwendung in glücklicher Art vereint und die Bibliothek eines jeden Biologen gehört. Eine Übertragung ins Deutsche wäre gewünscht.

W. J. Schmidt (Gießen)

Schneiderhöhn, H., Erzmikroskopisches Praktikum mit 113 Abb. im Text und auf 32 Kunstdrucktafeln, 39 Tabellen im Text und auf 2 Beilagen und einem Anhang mit 24 erzmikroskopischen Bestimmungstabellen. Stuttgart (E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Erwin Nägele) 1952. XII und 274 S., Preis gebunden DM 40,60.

Die Namen M. BEREK und H. SCHNEIDERHÖHN werden für alle Zeit mit der Erzmikroskopie verbunden bleiben: der erste als des theoretischen Bearbeiters der einschlägigen optischen Phänomene und des Schöpfers eines wesentlichen Teiles der Apparatur, der zweite als des höchst erfolgreichen Bearbeiters des Erfahrungsmaterials. Wer könnte also besser als der letzte ein erzmikroskopisches Praktikum verfassen, das dem Forscher erlaubt, bis in alle Einzelheiten die Methodik nach Theorie und Praxis anzuwenden? Nach einleitenden Bemerkungen über Notwendigkeit, Kennzeichnung und historische Entwicklung der Erzmikroskopie werden in 12 Teilen behandelt: Apparatur, Anfertigung von Erzanschliffen, optische Untersuchungsmethoden, Beobachtungen über Kohäsion, elektrische und magnetische Eigenschaften, chemische Reaktionen an Erzanschliffen zur Diagnose, mikrochemische, spektrophotographische und röntgenographische Bestimmung von Erzmineralen, Verfahren zur Entwicklung des Erzgefüges, insbesondere die Strukturätzung, Kornmessungen und Kornmessungen im Erzmikroskop, Lagebestimmungen von Erzmineralien im Anschliff und schließlich — nach einem Überblick über die Forschungsgegenstände und Aufgaben der Erzmikroskopie — Beobachtungen am Einzelmineral und Gefüge der Aggregate. Ein Anhang, selbständig beigegeben, umfaßt die erzmikroskopischen Bestimmungstabellen. Bei solchem Reichtum des Inhaltes würde ein näheres Eingehen auf Einzelheiten willkürlich bleiben. So kann nur zusammenfassend gesagt werden, daß Text und Abbildungen, von denen besonders die herrlichen Mikrophotogramme auf den Tafeln erwähnt seien, eine hervorragende Leistung darstellen. Das Buch ist ein Standardwerk, für jeden unentbehrlich, der auf diesem Gebiete arbeitet.

W. J. Schmidt (Gießen)

Hansen, H.-G., Rominger, A., Michel, K., Das Phasenkontrastverfahren in der Medizin. Göttingen (Vandenhoeck & Ruprecht-Verlagsbuchhandlung) 1952. 92 S., 120 Abb., Preis Leinen DM 8,—.

Das gut ausgestattete Büchlein gliedert sich in einen I. Teil, in dem MICHEL Wesen und Praxis des Phasenkontrastverfahrens in allgemein verständlicher und doch eindringender Art erläutert, und in einen II. Teil, in welchem HANSEN und ROMINGER über die Bedeutung des Verfahrens für die Medizin berichten; die mikrophotographische Bearbeitung lag in den Händen des Letztgenannten. Hier werden die Untersuchungstechnik behandelt und dann die Ergebnisse in Hämatologie, bei Organpunktionen und Geweben, die Anwendung in der pathologischen Histologie, der Nachweis von Tumorzellen in Organpunktionen, Exsudaten und Geweben, ferner Protozoen, Pilze, Bakterien, Körperflüssigkeiten und -ausscheidungen, Sekrete und Exsudate. Wie man sieht, handelt es sich vornehmlich um die Bedürfnisse der klinischen Medizin. Beiden Teilen ist die einschlägige Literatur in großer Vollständigkeit zugegeben. Die vorzüglichen Bilder belegen eindrucksvoll den hohen Wert des Verfahrens für die genannten Sachgebiete.

W.J.Schmidt (Gießen)

Tröger, W. E., Tabellen zur optischen Bestimmung der gesteinsbildenden Minerale. Erweiterte Fortführung von O. Mügges Hilfstabellen zur mikroskopischen Mineralbestimmung, aus der Physiographie der petrographisch wichtigen Mineralien von H. Rosenbusch. 5. Auflage 1927. Stuttgart (E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Erwin Nägele) 1952. XI und 147 S., 17 Tabellen, 95 Diagramme, 256 Figuren, 16 Stereogramme im Text und auf zwei Beilagen, 9 Nomogramme. Preis Leinen DM 27,80.

Verf. hat ein schönes, sehr nützliches Werk geschaffen, das in erster Linie den Mineralogen angeht, aber einem jeden Mikroskopiker dienlich sein kann; denn je nach der Arbeitsrichtung wird ihm öfter oder gelegentlich auch mineralisches Material in seinen Präparaten begegnen, dessen Bestimmung das Polarisationsmikroskop in so eleganter Weise ermöglicht. Von MÜGGES Hilfstabellen unterscheidet das Buch sich zunächst dadurch, daß den beschreibenden Tabellen vortreffliche Kristallbilder mit Kennzeichnung der Optik beigegeben sind, insbesondere mit eingetragenen Indicatrixachsen X, Y, Z (in fallender Größe), Achsenebene, Auslöschungsschiefe, Dichroismus. Gerade dadurch wird das Buch auch für den benutzbar, der mit den Flächensymbolen nicht genügend vertraut ist. Ferner sind viele, darunter auch erstmalig vom Verf. entworfene Nomogramme beigegeben, teils bestimmte Minerale betreffend, teils allgemeiner Art (z. B. Beziehungen zwischen n_x , n_y , n_z und Achsenwinkel, oder zwischen Doppelbrechung und Achsenwinkel). Weiter folgen Tabellen der Dichte, der Dispersion der Lichtbrechung der Minerale, dann solche zur konoskopischen Bestimmung am Spaltblättchen, weiter betr. Eigenfarbe und Pleochroismus. Die Ausstattung des Buches ist sehr gut; für die Tabellen freilich liefert die schrägliegende Schrift nicht das am bequemsten lesbare Druckbild.

W.J.Schmidt (Gießen)

Die Perchlorsäure und ihre Anwendung zum histochemischen Nucleinsäurenachweis

Von **Wolfgang Gössner**

Mit 2 Abbildungen

Einleitung

Beim histochemischen Nachweis der Nucleinsäuren (NS) spielt neben den Untersuchungen im ultravioletten Licht und der FEULGEN-Reaktion die Anwendung spezieller Nucleasen eine wesentliche Rolle. Das Verschwinden der Basophilie im histochemischen Präparat nach Behandlung mit Ribonuclease bzw. Desoxyribonuclease ermöglicht die Charakterisierung und Lokalisation der NS.

An der Zuverlässigkeit solcher Methoden wurde von verschiedener Seite Kritik geübt. Bei der Anwendung von Enzymtesten ist grundsätzlich möglichst hochgradige Einheit der Fermente zu fordern, d. h. ihre Aktivität muß auf ein einziges Substrat beschränkt sein. Außerdem müssen auch die übrigen Bedingungen bei der Durchführung der Enzymbehandlung so gewählt werden, daß aus dem Gewebe außer dem abbaufähigen Substrat nichts entfernt wird. Schließlich muß das betreffende Substrat in der Zelle in einer Form vorliegen, die eine Fermenteinwirkung überhaupt zuläßt. Es wäre z. B. möglich, daß die NS von einem Lipid- oder Proteinfilm umgeben sind und deshalb ein Fermentangriff verhindert wird. Andererseits ist es denkbar, daß eine Zellstruktur im Wesentlichen aus Protein besteht, aber durch NS mit den übrigen Protoplasmabestandteilen verknüpft ist. Diese Struktur würde dann aufgrund der enzymatischen Lösung der Verknüpfungen entfernt werden, ohne selbst das spezifische Substrat zu enthalten. Diese Verhältnisse werden weiter durch die Art der Fixierung kompliziert, deren Eingriff in die chemische Struktur des Cytoplasmas auch die Angriffsmöglichkeiten für Fermente abwandelt.

Trotz dieser prinzipiellen Schwierigkeiten, denen man bei der Anwendung von Enzymen in der Histochemie gegenübersteht und die durch die komplexe chemische Struktur biologischer Objekte bedingt sind, haben sich die betreffenden Methoden bei kritischer Anwendung als durchaus brauchbar erwiesen. Allerdings sollten sie möglichst mit anderen Verfahren der Histochemie oder Biochemie kombiniert werden, um erhobene Befunde zu bestätigen oder Unstimmigkeiten aufzudecken.

Leider ist es z. Zt. noch ziemlich schwierig, hochgereinigte Nucleasepräparate zu erhalten. Die cryst. Ribonuclease weist oft noch eine gewisse proteolytische Aktivität auf, die sich aber durch Erhitzen auf 80° C in saurem Milieu beseitigen läßt. In letzter Zeit wurden von KUNITZ und MC DONALD hochgereinigte Desoxyribonuclease und Ribonuclease hergestellt, die jetzt in Amerika im Handel sind. Die Beschaffung dieser kostspieligen Präparate stößt aber bei uns noch auf erhebliche Schwierigkeiten und die Selbstherstellung liegt außerhalb der Möglichkeiten eines gewöhnlichen histochemischen Laboratoriums.

Es wäre deshalb wünschenswert, wenn auch mit anderen Methoden als der Fermentbehandlung eine elektive Entfernung der NS aus dem Gewebe möglich wäre. In den letzten Jahren wurden in der Biochemie eine Anzahl von Extraktionsmethoden für NS entwickelt, die z. T. in der Histochemie angewandt werden können. SCHNEIDER konnte Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS) mit Tri-chloressigsäure (5%, 90 Grad C, 15 Min.) aus Gewebsbrei entfernen. Diese Methode wurde dann von POLLISTER und RIS, BRACHET und SHAVER und KAUFMANN, GALT und Mc DONALD in der Histochemie angewandt und hat sich auch in eigenen Untersuchungen durchaus bewährt. DEMPSEY, SINGER und WISLOCKI hydrolysierten mit n/Salzsäure (37 Grad C, 3 Std.) und auch STICH fand, daß mit n/Salzsäure (58 Grad C, 3 Min.) nur die RNS aus den Schnitten entfernt werden. Denselben Effekt erzielt STICH mit Salpetersäure (5%, 18 Grad C, 20—30 Min.). Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, daß HENRY und STACEY aus Bakterien und FOSTER und WILSON aus den β -Granula des Hypophysenvorderlappens die RNS mit Lösungen von Gallensalzen (2% Natriumcholat) extrahieren konnten.

In letzter Zeit wurde festgestellt, daß auch Perchlorsäure zur Extraktion der RNS geeignet ist. OGUR und ROSEN, ERICKSON, SAX und OGUR machten zuerst diese Beobachtung an pflanzlichem Material. SESHACHAR und FLICK wandten die Methode bei Protozoen an und SULKIN und KUNTZ untersuchten Material von Vertebraten. Sie behandelten in ZENKER fixierte Gewebsblöcke oder Gefrierschnitte mit kalter Perchlorsäure, Paraffinschnitte fanden sie nicht geeignet. Die Ergebnisse entsprachen fast völlig der Ribonucleasewirkung.

Da uns diese Methode nach orientierenden Versuchen als aussichtsreich erschien, hielten wir es zunächst für notwendig, die optimalen Bedingungen der Perchlorsäurehydrolyse an histologischen Präparaten (Paraffinschnitten) zu bestimmen und weiterhin festzustellen, inwieweit außer der Extraktion der RNS noch andere morphologische und stoffliche Veränderungen am Gewebe auftreten. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methoden

Die Versuche wurden in der Hauptsache an Mäuseorganen und -geweben (Leber, Pankreas, Zunge, Gehirn, Asciteskarzinom) durchgeführt. Außerdem wurden auch normale und pathologische menschliche Organe und Gewebe untersucht (Leber, Niere, Rückenmark, Schilddrüse, Trachea, Cervixpolyp u. a.).

An Fixierungsflüssigkeiten kamen zur Anwendung: Alkohol 96%, Formalin 3% CARNOY (Alkohol 6 T., Chloroform 3 T., Eisessig 1 T.), HELLY, ZENKER und BOUIN.

Folgende Färbungen bzw. histochemische Reaktionen wurden durchgeführt:

1. Darstellung der Nucleinsäuren.

- a) Gallocyanin-Chromalaun-Färbung nach EINARSON (s. ROMEIS).
- b) Gepufferte Toluidinblau- bzw. Methylenblaulösung (0,1% in Veronal-Azetat-Puffer pH 4,1). Nach der Färbung (10 Min.) Behandlung mit 5% Ammoniummolybdat (10 Min.) zur Fixierung des Farbstoffes, dann wässern und Alkoholreihe.
- c) Methylgrün-Pyronin-Färbung (Modif. nach GÖSSNER).
- d) FEULGEN-Reaktion (s. GLICK).
- e) Ribonuclease-Test (0,1 mg cryst. Enzym auf 1 ccm Aqua bidest. 30 Min. bei 37 Grad C).

2. Hämalaun-Eosin-Färbung.

3. Färbung mit sauren Farbstoffen.
1% Lichtgrün bzw. 1% Säurefuchsin in 1% Essigsäure.
4. Nachweis von Eiweißstoffen (Tyrosin).
MILLON-Reaktion (nach BENSLEY und GERSH, s. GLICK).
5. Nachweis metachromatischer Substanzen.
0,1% wäßrige Cresylviolett- bzw. Toluidinblaulösung. Nach der Färbung (10 Min.) abspülen in dest. Wasser und eindecken in APATHYS Gummisirup oder differenzieren in Alkohol, aufhellen in Xylol und eindecken in Rhenohistol.
6. Nachweis von Polysacchariden.
Perjodsäure-Leukofuchsin-Methode nach MC MANUS und HOTCHKISS (s. GLICK).
7. Amyloidnachweis.
Kongorotfärbung (s. ROMEIS).
8. Nachweis von Fettstoffen.
Sudanschwarz in 70% Alkohol (s. ROMEIS).

Ergebnisse

A. Einfluß verschiedener Extraktionsbedingungen und Fixierungen

Die ersten Versuche hatten zum Ziel, den Einfluß verschiedener Perchlorsäurekonzentrationen, der Zeitdauer und der Temperatur während der Behandlung zu untersuchen. Zugleich sollte das Verhalten nach verschiedenen Fixierungen geprüft werden. Dazu wurden gleich große Stücke Mäuseleber in den sechs oben genannten Fixierungslösungen fixiert und die in der üblichen Weise hergestellten Paraffinschnitte so aufgezogen, daß jeder Objektträger sechs verschieden fixierte Schnitte enthielt. Um ein Abschwimmen der Schnitte zu vermeiden, wurde mit 1% Celloidinlösung überzogen. Die so hergestellten Objektträger wurden mit Perchlorsäurelösungen von 1%, 5% und 10% bei Temperaturen von 5 Grad C, 21 Grad C und 37 Grad C und während einer Zeitdauer von 3, 6, 12, 18 und 24 Std. behandelt. Dann wurde eine halbe Stunde in fließendem Wasser gewaschen und mit Gallocyanin gefärbt. Zu diesen vergleichenden Versuchen ist die Gallocyaninfärbung am besten geeignet, da sie am sichersten reproduzierbare Ergebnisse liefert. Es ist eine rein progressive Färbung, bei der jedes Differenzieren wegfällt und die durch die zur Entfärbung notwendige Alkoholbehandlung nicht mehr verändert wird. Auf die Eignung und Spezifität der Gallocyaninfärbung zur Darstellung der NS wurde vor allem von LAGERSTEDT hingewiesen.

Die folgenden Angaben beziehen sich zunächst auf die Ergebnisse nach Alkohol und ARNOY-Fixierung.

Perchlorsäurekonzentrationen von 1% und 5% ergeben nur bei den höheren Temperaturen eine Abschwächung der Cytoplasmabasophilie.

Bei 10% Perchlorsäure beginnt die Abblässung des Cytoplasmas bei 5 Grad C nach 2 Std., nach 18 Std. ist das Cytoplasma nur noch ganz schwach und nach 24 Std. überhaupt nicht mehr gefärbt. In analoger Weise verhält es sich mit der Basophilie der Nucleoli. Im übrigen bleiben die Kerne unter diesen Bedingungen unverändert.

Bei den höheren Temperaturen und 10% Perchlorsäure kommt es schon nach drei Stunden zum Verschwinden der Cytoplasmabasophilie, aber auch zu einer zunehmenden Abblässung der Kerne; nach 12stündiger Behandlung bei 37 Grad C nehmen die Schnitte praktisch kein Gallocyanin mehr an, also weder Kerne noch Cytoplasma.

Nachdem sich so herausgestellt hatte, daß 10% Perchlorsäure bei Eisschranktemperatur (5 Grad C) die besten Voraussetzungen zur elektiven Entfernung der NS bietet, wurde unter diesen Bedingungen ein zweiter Versuch mit kurzen (1 bis

2 Std.) Zeitintervallen zwischen 6 und 24 Stunden angesetzt. Dabei sollte vor allem der Einfluß der verschiedenen Fixierungen festgestellt werden. Nach Alkohol und Carnoy-Fixierung entsprachen die Befunde dem ersten Versuch. Nach 5—14 Std. zeigt sich eine deutlich schwächere Färbung des Cytoplasmas, die nach 18 Std. fast und nach 24 Std. vollständig verschwunden ist. Dabei bleiben die Kerne unverändert, die Kernstruktur erscheint nach CARNOY etwas distinkter. Demgegenüber zeigen die in Formalin, ZENKER und HELLY fixierten Schnitte nach 24 Std. noch eine deutliche Cytoplasmabasophilie, die gegenüber den Kontrollen nur geringgradig abgeschwächt ist. Es ist wahrscheinlich, daß durch diese bekanntlich lipidstabilisierenden Fixierungsmittel der Angriff der Perchlorsäure an den RNS erschwert wird und sie daher für diesen Zweck nicht so geeignet sind. Auch nach BOUIN sind die Resultate unbefriedigend, die Cytoplasmabasophilie nimmt zwar etwas stärker als bei den eben beschriebenen Fixierungsmitteln ab, aber es verblassen auch die Kerne ziemlich schnell und stark.

Eine weitere Serie Objektträger mit verschiedenen fixierten Leberschnitten wurde in 10% Perchlorsäure bei 5 Grad C bis zu acht Tagen gelassen und in täglichen Abständen untersucht. Nach 3tägiger Behandlungsdauer hat auch in den mit Formalin, ZENKER und HELLY fixierten Geweben das Cytoplasma seine Basophilie verloren, begut erhaltener Kernfärbbarkeit. Dabei gibt HELLY die besten Strukturbilder. BOUIN ist ungeeignet, da auch die Kerne stark abblassen.

Es ist besonders bemerkenswert, daß auch nach 8tägiger Behandlung mit kalter Perchlorsäure die Kerne in ihrer Struktur unverändert und noch gut färbbar sind. Sie färben sich nur in geringem Grade schwächer als in den Kontrollpräparaten oder in denen nach 24stündiger Perchlorsäureeinwirkung. Dieser unter den angegebenen Bedingungen erhebliche zeitliche Unterschied in Beziehung auf den hydrolytischen Abbau der beiden Nucleinsäuretypen macht die Perchlorsäure für histochemische Zwecke besonders geeignet. Die optimalen Bedingungen zur Entfernung der RNS aus Paraffinschnitten nach Alkohol oder CARNOY-Fixierung mit 10% Perchlorsäure sind also 24stündige Einwirkung bei Eisschranktemperatur (5 Grad C), (Standardmethode).

Der Vergleich so hergestellter Präparate mit Kontrollschnitten, die mit Ribonuclease behandelt worden waren, ergibt völlig identische Bilder.

B. Wirkung der Perchlorsäure auf die RNS verschiedener Gewebe

Um den Einfluß der Perchlorsäure auf die RNS in verschiedenen Geweben zu prüfen, wurden außer Leber, Pankreas (Ergastoplasma), Gehirn (Ganglienzellen, Nucleolar- und NISSL-Substanz), Zunge (Plattenepithel) und Tumorzellen (Mäuseascitestumor) vergleichend untersucht. Die verschiedenen in CARNOY fixierten Gewebe wurden zusammen auf einen Objektträger aufgezogen, bis zu 24 Stunden mit kalter Perchlorsäure behandelt und in stündlichen Abständen nach Gallocyaninfärbung untersucht. Nach 24 Stunden sind die RNS aus sämtlichen untersuchten Geweben vollständig entfernt. Die Geschwindigkeit der RNS Extraktion aus den verschiedenen Geweben verläuft aber nicht gleichmäßig, wenn auch die Unterschiede nur gering sind. Am schnellsten werden die RNS aus dem Cytoplasma der Pankreaszellen herausgelöst. Berücksichtigt man dabei, daß in dem Ergastoplasma große Mengen RNS enthalten sind, die eine tiefe Basophilie bedingen, so ist besonders auffällig, daß dieselbe schon zwischen 12 und 16 Stunden praktisch völlig geschwunden ist. Etwa gleich schnell werden die RNS aus den Tumorzellen extrahiert, etwas langsamer verschwinden sie aus der Leber (etwa 18 Std.), dann aus den Ganglienzellen

(etwa 20 Std.) und schließlich aus dem Plattenepithel (etwa 22 Std.). Über die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens lassen sich bis jetzt noch keine sicheren Aussagen machen. Eine große Rolle wird sicher das in den Zellen verschiedene submikroskopische Milieu spielen; es wäre aber auch denkbar, daß Unterschiede in der chemischen Struktur der RNS verschiedener Gewebe bestehen.

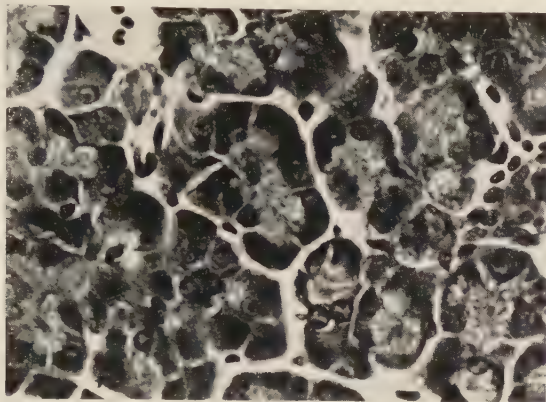


Abb. 1. Pankreas (Maus), CARNOY-Fixierung, Paraffinschnitt, Gallocyaninfärbung (EINARSON), Kontrollschnitt. Starke Basophilie des basalen Cytoplasmas (Ergastoplasma) und der Nukleolen.

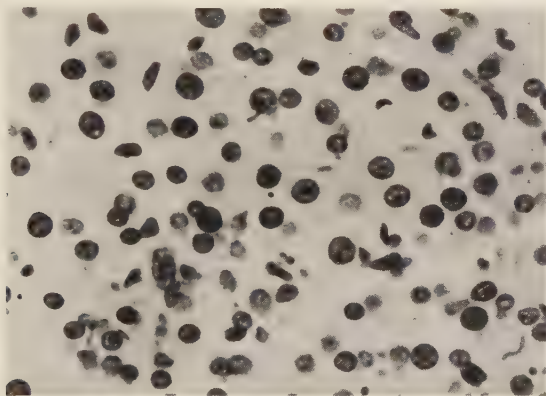


Abb. 2. Pankreas (Maus), CARNOY-Fixierung, Paraffinschnitt, 10% Perchlorsäure 21 Stunden bei 5 Grad C, Gallocyaninfärbung (EINARSON). Cytoplasmabasophilie völlig geschwunden; Nucleolen im Zentrum aufgeheilt, im übrigen Kernfärbung unverändert.

C. Befunde bei Färbung der NS mit verschiedenen basischen Farbstoffen

Mit gepufferten sauren Toluidin- bzw. Methylenblaulösungen lassen sich sowohl DNS als auch RNS gut darstellen. Diese Farbstoffe zeigen außerdem die Erscheinung der Metachromasie, wodurch bestimmte basophile Substrate (wie z. B. Schleim, Knorpel) gleichzeitig in differenter Weise gefärbt werden. Allerdings geben gelegentlich auch die NS eine Metachromasie (WISLOCKI, BUNTING und DEMPSEY; PEARSE); auch

bei den vorliegenden Untersuchungen konnte ab und zu dieser Befund erhoben werden; dabei scheint das Auftreten der Metachromasie ziemlich inkonstant zu sein.

Das Phänomen der Metachromasie hat zu verschiedensten Theorien Anlaß gegeben, ohne bis jetzt endgültig geklärt zu sein. Wesentlich sind die Untersuchungen von MICHAELIS, der zwei Arten von Metachromasie unterscheidet. Toluidinblau hat ein Absorptionsspektrum mit drei Banden, die mit alpha, beta und gamma bezeichnet werden. Die monomere alpha-Form ist blau, die dimere beta-Form violett und die polymere gamma-Form rot. Gamma-Metachromasie (Rot) ist alkoholfest und wird wahrscheinlich nur von den höheren Schwefelsäureestern (Chondroitinschwefelsäure, Mucoitinschwefelsäure, Heparin) gegeben. Die violette beta-Metachromasie, die weniger alkoholfest ist, kann durch hochpolymerisierte Kohlenhydrate und Phosphatverbindungen hervorgerufen werden. Hierzu gehört wohl auch die u. U. bei den NS auftretende Metachromasie.

Nach der Perchlorsäureextraktion (Standardmethode) geben Toluidinblau oder Methylenblau ein der Galloxyaninfärbung völlig entsprechendes Bild, es färben sich also nur noch die Kerne.

Bemerkenswert ist der Einfluß auf die Metachromasie der NS. In Leberschnitten tritt nach CARNOY-Fixierung und Methylenblaufärbung häufig eine violette beta-Metachromasie an den Kernen (DNS) auf. Dies ist besonders deutlich an Kernen mit dichter Chromatinstruktur (Kupffersche Sternzellen, Lymphozyten in Glissonschem Dreiecken). Bei den anderen Fixierungen ist diese Metachromasie überhaupt nicht oder nur angedeutet zu beobachten. Nach der Perchlorsäureeinwirkung ist sie völlig verschwunden, die Kerne sind orthochromatisch blau gefärbt, wie die cytoplasmatischen RNS vor der Perchlorsäurebehandlung. Es scheint uns in diesem Fall wahrscheinlich, daß die Metachromasie der DNS mit ihrem Polymerisationsgrad in Zusammenhang steht und nur bei einem höheren Polymerisationszustand in Erscheinung tritt; durch die Perchlorsäure aber kommt es zu einer Depolymerisation (s. weiter unten) und damit zum Verlust der Metachromasie.

Bei Färbung mit den beiden basischen Farbstoffen Methylgrün und Pyronin verschwindet nach der Perschlorsäureeinwirkung die Pyroninophilie des Cytoplasmas und der Nucleolen, nur die Kerne sind gefärbt, allerdings nicht mehr grün, wie in den Kontrollschnitten, bzw. den mit Ribonuclease behandelten, sondern rot. Bei Färbung mit Methylgrün allein nehmen die Kerne fast keinen Farbstoff mehr an. Auf Grund der Untersuchungen von KURNICK scheint die Anfärbbarkeit mit diesen beiden Farbstoffen vom Polymerisationszustand der NS abzuhängen; höher polymerisierte NS (im allg. die DNS) färben sich mit Methylgrün, niedere Polymerisationsstufen mit Pyronin. Der Verlust der Färbbarkeit mit Methylgrün und die Rotfärbung der Kerne mit Pyronin nach der Perchlorsäure ist demnach wohl auf eine solche Depolymerisation der DNS zurückzuführen.

D. Perchlorsäure und FEULGEN-Reaktion

Die FEULGEN-Reaktion wird heute fast allgemein als spezifisch für DNS angesehen (Lit. s. bei LUMB). Nach Perchlorsäure (Standardmethode) bleibt sie positiv und entspricht in ihrer Intensität den Kontrollschnitten. Ohne die übliche Salzsäurehydrolyse und bei sofortiger Kupplung mit Leukofuchsin nach der Perchlorsäure findet sich eine schwache Anfärbung der Kerne. Die Perchlorsäurehydrolyse führt also auch allein zum Auftreten freier Aldehydgruppen an den DNS, allerdings ist die Reaktion unter diesen Bedingungen noch nicht optimal. Auch nach achttägiger Perchlorsäureeinwirkung bleibt die FEULGEN-Reaktion noch positiv.

E. Einfluß der Perchlorsäure auf die Färbbarkeit mit sauren Farbstoffen (basische Proteine) und die mikroskopische Struktur

Mit Hämalun-Eosin gefärbte Schnitte tierischer und menschlicher Gewebe zeigen nach der Perchlorsäure keinerlei strukturelle Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Alle RNS-haltigen Zellbestandteile haben ihre Basophilie verloren und färben sich nur noch mit Eosin.

Bei alleiniger Färbung mit sauren Farbstoffen (Lichtgrün, Säurefuchsin), mit denen die basischen Proteine dargestellt werden (SCHRADER und LEUCHTENBERGER), finden sich ohne und mit Perchlorsäure völlig identische Bilder. Die Nucleolen färben sich im allgemeinen auf Grund ihres reichlicheren Gehaltes an basischen Proteinen intensiver als das Cytoplasma.

F. Einfluß der Perchlorsäure auf histochemische Reaktionen zum Nachweis verschiedener Stoffgruppen

1. Eiweißstoffe

Mit der MILLON-Reaktion zum Nachweis tyrosinhaltiger Eiweißkörper wurden in CARNOY fixierte Paraffinschnitte von Schilddrüse und Amyloidleber untersucht. Neben einer schwachen diffusen rötlichen Färbung geben das Schilddrüsenkolloid und die Amyloidsubstanz eine kräftigere Reaktion, deren Ausfall durch die Perchlorsäure nicht beeinflußt wird.

Desgleichen wird die Kongorot-Reaktion der Amyloidsubstanz durch Perchlorsäure nicht verändert.

2. Fettstoffe und Lipoproteidkomplexe

Zur Darstellung der Fettverbindungen wurde Sudanschwarz gewählt, weil damit Lipide, Lipoide und Phosphatide am vollständigsten erfaßt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. Auch hierbei zeigt sich keinerlei Unterschied im Ausfall der Färbung vor und nach der Perchlorsäure.

Tabelle I

Material	Methode	Perchlorsäure	
		vorher	nachher
Markscheiden, Rückenmark . . .	Formol-Gefrier-Sudanschwarz	+++	unveränd.
Markscheiden, Rückenmark . . .	Alkohol-Paraffin- "	++	"
Pigment in Ganglienzellen . . .	Formol-Gefrier- "	+++	"
Pigment in Ganglienzellen . . .	Alkohol-Paraffin- "	++	"
Corpora amylacea (Rückenmark) .	Formol-Gefrier- "	+	"
Corpora amylacea (Rückenmark) .	Alkohol-Paraffin- "	+	"
Fettropfen in Leberzellen . . .	Formol-Gefrier- "	+++	"
Lipoidtropfen in Kupfferschen Sternzellen	Formol-Gefrier- "	+++	"
Lipofuscin in Leberzellen	Formol-Gefrier- "	+++	"
Lipofuscin in Leberzellen	Alkohol-Paraffin- "	++	"

Intensität der Sudanschwarzfärbung: +++ stark, ++ mittel, + schwach.

3. Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteide

Zum Nachweis dieser polysaccharidhaltigen Verbindungen wurde die Perjodsäure-Leukofuchsin-Methode nach HOTCHKISS und McMANUS angewandt. Durch die Perjodsäure werden 1,2-Glykole oder Aminoglykole zu Dialdehyden oxydiert, die darauf

mit SCHIFFS Reagens nachgewiesen werden können. Die Zahl der im tierischen Organismus vorkommenden Verbindungen, die die Voraussetzungen zu einer positiven HOTCHKISS-Reaktion geben, ist recht groß. Es handelt sich im wesentlichen um folgende Stoffgruppen (n. PEARSE):

Polysaccharide (Glykogen), Mukopolysaccharide (Mucin, Hyaluronsäure, Heparin), Muko- und Glykoproteide (Mucoid, gonadotropes und thyreotropes Hormon des Hypophysenvorderlappens, Serumalbumin, und -globulinfractionen), Glykolipide (Cerebroside). Die weitere Differenzierung dieser Stoffe ist zum Teil möglich, erfordert aber die Anwendung vielfacher Verfahren der Histochemie. Wegen ihres breiten Reaktionsspektrums erscheint diese Methode besonders geeignet, einen etwaigen Einfluß der Perchlorsäure auf verschiedene im Gewebe vorkommende Substanzen der eben angeführten Art nachzuweisen. Zur Ergänzung wurde an demselben Untersuchungsmaterial das Verhalten gegenüber dem metachromatischen Farbstoff Cresylviolett geprüft. Die an den verschiedenen untersuchten Gewebs- und Zellbestandteilen erhaltenen Befunde sind in Tabelle II zusammengestellt. Das wesentliche Ergebnis auch dieser

Tabelle II

Material	v. Perchlors.	n. Perchlors.	v. Perchlors.	n. Perchlors.
Schleimdrüsen (Cervix, Trachea)	+++	unveränd.	M	unveränd.
Mucin (Cervix, Trachea)	+++	"	M	"
Knorpel (Trachea)	++	"	M	"
Colloid (Schilddrüse)	+++	"	O	"
Hyalin (Schilddrüse)	++	"	O	"
Hyaline Tropfen (Niere)	+++	"	O	"
Russelsche Körperchen	+++	"	O	"
Corpora amylacea (Rückenmark)	+++	"	M	"
Amyloid (Leber)	++	"	M	"
Kollagen	++	"	O	"
Elastin	+	"	O	"
Basalmembranen	++	"	O	"
Braunes Pigment (Ganglienzellen)	++	"	O	"
Lipofuscin (Leber)	++ u.	"	O	"
Nissl-Substanz (Rückenmark)	0	"	O	entfärbt
Cytoplasma (Plasmazellen,	+ u.	"	O	"
Leberzellen)	0	"	O	"

Intensität der Hotchkiss-Reaktion: +++ stark, ++ mittel, + schwach, 0 negativ, u. unregelmäßig; M = metachromatisch, O = orthochromatisch

Untersuchungen ist, daß die Perchlorsäurebehandlung auch auf den Ausfall dieser beiden Reaktionen keinerlei Einfluß hat. Daraus kann geschlossen werden, daß diesen Reaktionen zugrunde liegenden chemischen Substrate durch die Perchlorsäure nicht wesentlich verändert werden. Es sei besonders betont, daß die Metachromasie von Schleim, Knorpel und Amyloid nicht beeinflußt wird, im Gegensatz zu den Nucleinsäuren (s. oben).

Zusammenfassung

Mit Perchlorsäure ist die Extraktion der RNS aus Paraffinschnitten tierischer Gewebe möglich.

Eine 24stündige Behandlung mit 10% Perchlorsäure bei 5 Grad C nach CARNOY-Fixierung erwies sich auf Grund der Untersuchungen unter variierten Bedingungen als optimal (Standardmethode) und ergibt einen Befund, der dem nach Ribonucleasebehandlung völlig gleicht.

Fixierung in HELLY, ZENKER oder Formalin ist weniger geeignet, da die Cytoplasma-
asophilie erst nach etwa 3tägiger Perchlorsäurebehandlung völlig schwindet. Ver-
sauerung der Perchlorsäureeinwirkung unter den oben genannten Bedingungen bis
zu 8 Tagen hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Kernstruktur und -färbbarkeit.
Die Extraktionsgeschwindigkeit zeigt bei verschiedenen Geweben geringe Unter-
schiede. Am schnellsten lassen sich die RNS aus dem Pankreascytoplasma, am lang-
samsten aus der Epidermis extrahieren.

Nach Perchlorsäure (Standardmethode) verlieren die Zellkerne die Fähigkeit, sich
mit Methylgrün zu färben, nehmen aber noch Pyronin an. Dies beruht wahrscheinlich
auf einer Depolymerisation der DNS durch die Säure.

Auf gleiche Weise wird das Verschwinden der Metachromasie der DNS nach
Methylenblaufärbung gedeutet.

Die Intensität der FEULGEN-Reaktion wird bei Anwendung der Standardmethode
nicht beeinflußt.

Vergleichende Untersuchungen zur Frage unerwünschter Nebeneffekte der Per-
chlorsäure wurden an zahlreichen Geweben und Gewebsbestandteilen mit verschie-
denen Färbungen und histochemischen Reaktionen (saure Farbstoffe, Sudanschwarz,
Metachromasie, Kongorot, Perjodtsäure-Leukofuchsin, MILLON-Reaktion) durchge-
führt. Danach führt die Perchlorsäure, unter den angegebenen Bedingungen, zu kei-
nen auffallenden Veränderungen der morphologischen Struktur und der histoche-
mischen Reaktionen verschiedener chemischer Gewebssubstrate (Eiweißkörper, Lipid-
verbindungen, Mukopolysaccharide usw.).

Für histochemische Untersuchungen hat die Perchlorsäurehydrolyse gegenüber
dem enzymatischen Abbau der RNS mit Ribonuclease den Vorteil größerer Einfach-
heit der Durchführung und besserer Reproduzierbarkeit und kann daher als Ersatz
bzw. als Ergänzung desselben angewandt werden. Dabei ist ihre Wirkung im wesent-
lichen auf die RNS beschränkt; der geringe Einfluß auf die DNS (Depolymerisation)
macht sich nicht besonders störend bemerkbar und tritt z. B. bei Galloccyaninfärbung
überhaupt nicht in Erscheinung.

Schrifttum

- 1) BRACHET, J., und J. R. SHAVER: Stain Technol. **23**, 177 (1948).
- 2) DEMPSEY, E. W., M. SINGER und G. B. WISLOCKI: Stain Technol. **25**, 73 (1950).
- 3) Mc DONALD, M. R.: Journ. Gen. Physiol. **32**, 33 u. 39 (1948).
- 4) EINARSON, L.: Acta path. scand. (Kopenh.) **28**, 82 (1951).
- 5) ERICKSON, R. O., K. O. SAX und M. OGUR: Science **110**, 472 (1949).
- 6) FOSTER, C. F., und R. R. WILSON, Nature (London) **167**, 528 (1951).
- 7) GLICK, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry, Interscience Publ. New York 1949.
- 8) GÖSSNER, W.: Zbl. f. Path. **89**, 175 (1952).
- 9) HENRY, H., und M. STACEY: Nature (London) **151**, 671 (1943).
- 10) HOTCHKISS, R. D.: Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948).
- 11) KUNITZ, M.: Journ. Gen. Physiol. **24**, 15 (1940); Science **108**, 19 (1948); Journ. Gen. Physiol. **33**, 349 (1950).
- 12) KURNICK, N. B.: Journ. Gen. Physiol. **33**, 243 (1950).
- 13) KAUFMANN, B. P., H. GAY und M. R. Mc DONALD: Amer. J. Botany **38**, 268 (1951).
- 14) LAGERSTEDT, S.: Acta Anat. (Basel) **5**, 217 (1948).
- 15) LUMB, E. S.: Quart. Rev. of Biol. **25**, 278 (1950).
- 16) Mc MANUS, J. F. A.: Nature (London) **158**, 202 (1946).
- 17) MICHAELIS, L.: Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 142 (1947).
- 18) OGUR, M., und G. ROSEN: Fed. Proc. **8**, 234 (1949).
- 19) PEARSE, A. G. E.: J. of clin. Path. **4**, 1 (1951).
- 20) POLLISTER, A. W., und H. RIS: Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 147 (1947).
- 21) ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, Leibniz Verlag, München 1948.
- 22) SCHNEIDER, W. C.: J. biol. Chem. **161**, 193 (1945).

- 23) SCHRADER, F., und C. LEUCHTENBERGER: Exper. Cell Res. **1**, 421 (1950).
- 24) SESHACHAR, B. R., und E. W. FLICK: Science **110**, 659 (1949).
- 25) STICH, H.: Z. f. Naturf. **60**, 259 (1951).
- 26) SULKIN, N. M., und A. KUNTZ: Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. **73**, 413 (1950).
- 27) WISLOCKI, G. B., H. BUNTING und E. W. DEMPSEY: Amer. J. Anat. **81**, 1 (1947).

[Eingegangen am 2. Dezember 1952]

Aus dem Rudolf Virchow-Haus der Charité,
dem Institut für Pathologie der Humboldt-Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. E. ANDERS †

Über den Einfluß der Fixierung und der Wässerung auf die Struktur des Lungengewebes¹⁾

Mit 15 Abbildungen

Von J. Rahn

A. Problemstellung

Anläßlich der Durchsicht der histologischen Präparate, die im Rahmen pathologisch-anatomischer Untersuchungen zum Problem der Atelektase angefertigt wurden²⁾, machten wir die Feststellung, daß zwischen den Befunden des Lungengewebes bei der Sektion und denen bei der nachfolgenden histologischen Untersuchung oft recht erhebliche Unterschiede bestehen. So fiel uns z. B. auf, daß manche bei der Sektion als Atelektase diagnostizierte Lungenpartie nach der histologischen Bearbeitung im gefärbten Schnittpräparat keine Zeichen der Atelektase mehr aufwies. Ferner machten wir die Beobachtung, daß makroskopisch sicher luftleere Lungenpartien im Gefrierschnitt bei 20 μ dicken, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten ein vollkommen solides Lungengewebe ohne jeden Luftgehalt und ohne Darstellung von Alveolen aufwiesen. Dieselbe Stelle zeigte dagegen bei Dünnerwerden des Schnittes bis 5 μ , daß schon bei einer Schnittdicke von 10 μ von einem „soliden“ Organ keine Rede mehr sein kann: Die Alveolen sind größtenteils lufthaltig und zeichnen sich nur durch einen verminderten Luftgehalt gegenüber den emphysematösen Randpartien aus. Hin und wieder finden sich verdickte Partien, die ihrer Struktur nach das vollkommene Fehlen alveolärer Bildungen erkennen lassen.

Auf Grund dieser Beobachtungen haben wir uns die Frage vorgelegt, ob das Lungengewebe so zur histologischen Untersuchung zubereitet werden kann, daß sein histologisches Strukturbild dem vor der Bearbeitung gleich ist. Es handelt sich hier um das Problem der wirklichkeitsgetreuen Darstellbarkeit von Organgewebe, das schon öfter der Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen war. Obwohl in

¹⁾ Auf Wunsch der Redaktion wurde das ausführliche Erstmanuskript aus Gründen des Platzmangels erheblich gekürzt.

²⁾ Nach Abschluß unserer Untersuchungen über das Problem der Atelektase wird hierüber an anderer Stelle zusammenfassend berichtet werden. D. Verf.

sen Untersuchungen mehrfach das Leber- und Milzgewebe (BERG [2] und andere Autoren) sowie das Gehirngewebe (NISSL [6], SPATZ [10], BENDIEN und GANS [1]) hinsichtlich seiner Veränderungen bei der Fixierung geprüft worden ist, haben wir im Schrifttum von gleichen oder ähnlichen Untersuchungen des Lungengewebes nichts finden können bis auf zwei beiläufig gemachte Bemerkungen. Hierin wurde lediglich auf die Möglichkeit des Verschwindens von Atelektasen beim Schneiden des eingeborenen (SCHÖNBERG [9]) sowie beim Aufziehen des in Paraffin eingebetteten und dann erst geschnittenen Lungengewebes (LOESCHKE [4]) hingewiesen.

Die wirklichkeitsgetreue Darstellung des Lungengewebes ist von grundlegender Wichtigkeit, da es sich bei der Lunge um ein Organ handelt, das im Gegensatz zu anderen parenchymatösen Organen in Verbindung mit den chemischen Aufgaben Bewegungsvorgänge zeigt, wie sie in dieser besonderen Form und Eigenart sonst im Organismus nicht zu beobachten sind. Diese Bewegungsvorgänge betreffen nicht nur die gesamte Lunge, sondern auch ihre einzelnen Abschnitte und bilden unter pathologischen Bedingungen die Grundlage für Gestaltsveränderungen des Lungengewebes, wie z. B. die akute Atelektase oder das akute vesikuläre Emphysem. Über Einzelheiten der Entstehung dieser Gestaltsveränderungen der Lunge ist bisher nur wenig an gesicherten Erkenntnissen bekannt geworden. Für die Beurteilung der Art dieser Gestaltsveränderungen ist die Größe der Alveolen sowie ihr Inhalt maßgebend. Wie an dieser Stelle auf ihre Ursachen näher einzugehen, sei im vorliegenden Zusammenhang lediglich hervorgehoben, daß es Gestaltsveränderungen des Lungengewebes gibt, bei denen die strukturgebende Substanz und hier insbesondere die Inter-alveolarräume keine wesentlichen pathologischen Befunde, wie z. B. den Schwund von Faserstrahlen oder dergleichen mehr erkennen lassen. Diese besonderen Beobachtungen sind entsprechend ihrem klinischen Verlauf als akute Gestaltsveränderungen des Lungengewebes aufzufassen und den chronischen Gestaltsveränderungen des Lungengewebes gegenüberzustellen, die mit einer wesentlichen Alteration der strukturgebenden Substanz einhergehen. Die akuten Gestaltsveränderungen des Lungengewebes, wie z. B. die akute Atelektase und das akute vesikuläre Emphysem, zeichnen sich durch eine auffallende Flüchtigkeit ihres Erscheinungsbildes aus, so daß sie entsprechend einem Vorschlag von H. E. ANDERS auch als funktionelle Atelektase bzw. als funktionelles Emphysem bezeichnet werden sollten.

Da die besondere Flüchtigkeit der akuten Gestaltsveränderungen des Lungengewebes auch bei dem Prozeß der Fixation zu beobachten ist, hat uns die Frage interessiert zu untersuchen, ob dieser Flüchtigkeit von akuter Atelektase und akutem vesikulärem Emphysem eine Gesetzmäßigkeit im Hinblick auf einen bestimmten Reaktionsmodus bei einer bestimmten Behandlung des Lungengewebes zugrundeliegt. Eine derartige spezielle Fragestellung setzt aber als Vorbedingung die Kenntnis der Reaktion des nicht pathologisch veränderten Lungengewebes voraus. Da uns auch hierüber Untersuchungsergebnisse nicht bekannt geworden sind, haben wir uns in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe gestellt, auf Grund einiger Untersuchungen einen Überblick über die möglichen Reaktionen sowohl des normalen, als auch des i. S. der akuten Atelektase oder des akuten und chronischen Emphysems veränderten Lungengewebes zu erlangen.

In Anbetracht der anatomischen und funktionellen Eigenart der Lunge ist die Frage ihrer wirklichkeitsgetreuen Darstellung der Gewebsstrukturen der Lunge von zwei besonderen Fragenkomplexen abhängig. Der eine Komplex betrifft die Frage, wie sich das Lungengewebe infolge der bei der Eröffnung des Pleuraspaltes einsetzenden Retraktion des Organs verändert. Die Bedeutung der Lungenretraktion im Hinblick auf den Vergleich des Lungengewebes nach Eröffnung des Thorax mit dem Zu-

stand desselben bei unversehrttem Pleuraspalt soll in einer späteren Arbeit besprochen werden. Der andere Fragenkomplex dagegen betrifft die Veränderungen des Lungengewebes, die bei dem Prozeß der Fixation und bei der nachfolgenden Behandlung des Schneidens und Färbens des Gewebes auftreten. Von diesen zuletzt aufgezählten Faktoren haben uns die bei der Fixierung zu beobachtenden Veränderungen des Lungengewebes besonders interessiert.

Die Fixierung³⁾ des Gewebes bezweckt die Erhaltung seiner Strukturen in einer Form, wie sie der ursprünglichen vor Beginn der Behandlung gleich ist⁴⁾. In zahlreichen Untersuchungen ist bereits hierüber zusammenfassend festgestellt worden, daß bei jeder der bekannten Fixierungsflüssigkeiten, wie z. B. Formalin, Sublimat-Eisessig oder Alkohol, mehr oder weniger erhebliche Veränderungen zu beobachten sind, die sowohl von der Art des Gewebes als auch von der Art des Fixierungsmittels abhängig sind (ausführliche Schrifttumshinweise siehe bei ROMEIS [8]).

Um die Veränderungen des Gewebes zu untersuchen und ihr Ausmaß exakt festzustellen, hat man sich der Methode der Messung bedient. Soweit diese Messungen an Zellkernen und ganzen Zellen (Schrifttum siehe bei ZEIGER [16] und bei ROMEIS [8]) vorgenommen wurden, führten sie zu exakten Ergebnissen. Schwieriger ist es aber, die Veränderungen der Interzellulärsubstanz mit der gleichen Methode zu bestimmen, da sich diese nicht wie die Zellen aus Struktureinheiten zusammensetzt, sondern neben einem zum Syncytium vereinigten Fasergeflecht noch Eiweißsubstanzen enthält, die einen jeweils verschiedenen physikalisch-chemischen Zustand aufweisen und deshalb nur schwer einer exakten Messung unterzogen werden können. So ist es in der Praxis nur möglich, das Gewebe in seiner Gesamtheit zu messen, mithin also seinen Umfang und sein Volumen zu bestimmen, um dann durch die nachfolgende histologische Untersuchung die Veränderungen der einzelnen Gewebsbestandteile genau zu messen.

Eine weitere erhebliche methodische Schwierigkeit ist dann gegeben, wenn die infolge der Fixierung aufgetretenen Veränderungen des Gewebes untersucht werden sollen. Da die weitere Zubereitung des Gewebes zur histologischen Untersuchung nach Abschluß der Fixierung neue zusätzliche Veränderungen bedingt, wird die histologische Beurteilung der lediglich infolge der Fixierung aufgetretenen Gewebeveränderungen und ihre Abgrenzung von später aufgetretenen Veränderungen, z. B. beim Schneiden und Färben, zur Unmöglichkeit.

Eine andere Schwierigkeit der Beurteilung von Gewebsveränderungen infolge einer bestimmten Behandlung ist in der Tatsache zu erblicken, daß alle Gewebe mehr oder weniger Hohlräume enthalten, d. h. porös sind. Die Porosität des Gewebes kann zu Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Gewebsveränderungen führen, wenn sie erheblich ist. Ein solcher Fall ist dann gegeben, wenn die Hohlräume nicht nur aus den Lumina kleiner Blutgefäße, sondern wie z. B. bei der Lunge, aus einem System von großen luftgefüllten Kammern bestehen. In der außerordentlichen Schwierigkeit, die einer möglichst exakten Nachprüfung von Gestaltsveränderungen des Lungengewebes gerade mit seiner erheblichen Porosität gegeben ist, scheint auch die Tatsache begründet zu sein, daß das Lungengewebe bisher noch nicht zum Gegenstand von Untersuchungen gemacht worden ist, die die Veränderungen des Gewebes infolge der Fixierung sowie der nachfolgenden Zubereitung des Schnittes zur Aufgabe hatten. So wenig sich das Lungengewebe auf Grund seiner erheblichen Porosität für Untersuchungen dieser Art eignet, so groß scheint uns das praktische Bedürfnis zu sein, auch das Lungengewebe einer solchen Untersuchung zu unterziehen.

Außer den Veränderungen des Lungengewebes, die infolge der Einwirkung des Fixierungsmittels auftreten, hat uns aber auch die Frage interessiert, wie sich das Lungengewebe unter der Einwirkung von Leitungswasser verändert. Die Beobachtung am Sektionstisch lehrt, daß jedes Gewebe unter der Einwirkung des Wassers seine Form und sein Aussehen ändert. Obwohl in den Sektionsvorschriften immer wieder auf diese Besonderheit hingewiesen und vom Wässern sowie vom Bespülen der Organe nachdrücklich abgeraten wird, ist es uns bisher nicht möglich gewesen, im

³⁾ In der vorliegenden Arbeit soll auf den Unterschied zwischen Fixierung und Härtung nicht eingegangen werden. Es sei hier nur betont, daß z. B. TELLYESNICZKY [11] sowie GROSS und LOHAUS [3] zwischen Fixierung und Härtung keinen Unterschied machen. D. Verf.

⁴⁾ WERNER [15] geht über diese allgemein gebräuchliche Definition der Fixierung noch hinaus und verlangt, daß durch diesen Prozeß das Gewebe in einen Zustand übergeführt werden soll, „in dem es die folgenden Prozeduren möglichst ohne Veränderungen übersteht“. D. Verf.

nichtum Hinweise zu finden, in denen auf Grund von Untersuchungen die Art und das Ausmaß der Veränderungen dargestellt werden, die infolge des Zusammenbringens der Lunge mit Wasser entstehen. Deshalb haben wir uns entschlossen, in mehreren Versuchsreihen den Einfluß der Wässerung auf das Lungengewebe zu untersuchen.

Hinsichtlich der zuletzt aufgeführten Fragestellung sind wir uns der Tatsache bewußt, daß das Wässern des Lungengewebes für die übliche Pathologische Anatomie nur ein Experiment darstellt, das keine praktische Bedeutung besitzt. Für die Gerichtspathologie dagegen dürften diese Untersuchungen insofern aufschlußreich sein, als sie bei den Sektionen Ertrunkener, die eine kürzere oder längere Zeit im Wasser gelegen haben, die Möglichkeiten aufzeigen, wie sich das Lungengewebe unter der Wassereinwirkung verändern kann.

Über die gerichtsmedizinische Bedeutung dieser Experimente hinaus besitzen unsere Wässerungsversuche aber auch eine Bedeutung für die Frage des Wasserbindungsvermögens des Gewebes, auf die an entsprechender Stelle ausführlich einzugehen sein wird.

Wir haben uns bemüht, in den hier vorgelegten Untersuchungen weniger die theoretischen als die praktischen Fragenkomplexe in den Vordergrund zu stellen und einen möglichst großen Überblick über die einzelnen Modi der artefiziellen Lungenveränderungen zu erlangen. Hierbei kann es nicht ausbleiben, daß unsere Untersuchungsergebnisse in einigen Fällen keine eindeutige Beurteilung des jeweils erfolgten Vorganges zulassen, sondern lediglich neue Gesichtspunkte für spätere Untersuchungen eröffnen. So sei schon an dieser Stelle die Feststellung vorweggenommen, daß die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Untersuchungsbefunde in keiner Richtung den Anspruch auf Vollständigkeit erheben. Unsere Untersuchungsbefunde sollen lediglich eine Orientierung über die Lungenveränderungen bei der Fixierung und bei der Wässerung des Gewebes bedeuten. Auch für die vorliegende Fragestellung müssen wir MÖLLENDORFF [5] zustimmen, wenn er feststellt, daß wir uns hinsichtlich der Lunge im Anfange der Forschung befinden“.

B. Untersuchungsmethodik

Nach Durchführung einiger Vorversuche wurde in 15 Versuchsreihen das Lungengewebe menschlicher Leichen untersucht. Die in einer Versuchsreihe zusammengefügten einzelnen Gewebsstücke entstammen jeweils einer Lunge.

Es wurden Fälle aller Altersstufen berücksichtigt, so war der jüngste Fall eine unreife weibliche Geburten- und der älteste ein 69 Jahre alter Mann. Hinsichtlich des Geschlechtsunterschiedes hatten 9 männliche 6 weiblichen Leichen gegenüber.

Während in 2 Fällen die Zeit zwischen dem Eintritt des Todes und dem Beginn der Sektion nicht errechnet werden konnte, betrug sie in den übrigen 13 Fällen im Durchschnitt 29 Stunden. Der im Vergleich zu anderen Pathologischen Instituten auffallend große Zeitraum zwischen dem Eintritt des Todes und dem Beginn der Sektion erklärt sich aus den vor einem Jahr, als die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden, für uns gegebenen Bestimmungen, die in der Leichenzeit durch neue ersetzt wurden, nach denen uns jetzt die Sektion auch kurz nach Eintritt des Todes gestattet ist.

Das zur Untersuchung ausgewählte Lungengewebe wurde bei der Sektion makroskopisch hinsichtlich der Weite der Alveolen beurteilt, en bloc der Lunge entnommen und anschließend mit der Lupe nochmals kontrolliert. Hierbei wurde besonders darauf achtet, daß alle Teile des entnommenen Lungengewebes hinsichtlich ihrer Alveolenweite ein einheitliches Bild darboten. Dann wurden aus diesem Gewebsstück mit einer scharfen Klinge unter Vermeidung jeden Drucks jeweils 6 bzw. 3 kleinere Stücke entnommen, die eine Kantenlänge von annähernd 1 cm aufwiesen. Jedes dieser einzelnen Gewebsstückchen wurde nun vermessen und sein Rauminhalt errechnet. Diese Zahlen setzten wir als Anfangswert mit den entsprechenden späteren Messungsergebnissen prozentual in Beziehung. Die Veränderungen des einzelnen Gewebsstückes gaben wir so in Form von Prozentwerten als Zu- oder Abnahme der Größe des Stückes veranschaulicht dargestellt werden.

Hinsichtlich der Auswahl des zu untersuchenden Lungengewebes sei bemerkt, daß neben makroskopisch normal erscheinendem Lungengewebe nur Veränderungen i. S. der Atelektase, des Emphysems und des Ödems berücksichtigt wurden. Lungengewebe mit einer Pneumonie haben wir nicht untersucht.

In einigen Versuchsreihen wurde neben den erwähnten Messungen jedes Gewebstück zusätzlich gewogen. Da der Vergleich der Ergebnisse von Wägung und Messung keine wesentlichen Abweichungen ergab, haben wir den vorliegenden Kurven nur die Messungsergebnisse zugrunde gelegt.

Außer den zusätzlichen Wägungen haben wir auch die Verdrängung der Flüssigkeit nach Erbringen der Untersuchungsstücke in einen mit der entsprechenden Fixationslösung oder Wasser gefüllten Meßzylinder berechnet und Vergleiche mit den Messungsergebnissen angestellt. Da sich auch bei dieser Methode keine wesentlichen Abweichungen gegenüber den einzelnen Messungswerten ergaben, wurde dieses Verfahren nur jeweils in besonderen Fällen, so z. B. bei erheblicher Verformung des Lungenstückchens, zur Kontrolle der Messungsergebnisse benutzt.

Als Fixierungsmittel wurde im einzelnen eine nicht neutralisierte 10%ige Formalinlösung, 96%iger unvergällter Alkohol und Sublimat-Eisessig verwendet. Die Fixierung erfolgte stets bei Zimmertemperatur. In einigen Fällen haben wir jedoch die Formalinfixation auch mittels der beiden Schnellverfahren durchgeführt. Diese bestehen erstens in 5 Minuten langem Kochen des Gewebes und zweitens in der Fixierung bei einer Temperatur von 60° Celsius im Brutschrank.

Um den Einfluß der Wässerung auf das Lungengewebe untersuchen zu können, wurden in mehreren Versuchsreihen Lungenstückchen in Leitungswasser eingelegt und ihre Veränderungen bestimmt. In weiteren Fällen haben wir im Anschluß an die Wässerung des Gewebes die Fixierung in Formalin vorgenommen und die Veränderungen des so vorbehandelten Lungengewebes in Vergleich zu den nur mit Formalin oder anderen Lösungen fixierten Stückchen gesetzt.

C. Untersuchungsbefunde

Im folgenden seien die einzelnen Versuchsreihen mit ihrer jeweils besonderen Versuchsanordnung und ihren Messungsergebnissen in Form von Kurven mitgeteilt. Siehe Seite 391, 392, 393, 394, 395!

D. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

1. Die Veränderungen des Lungengewebes bei Fixierung mit 10%iger nicht neutralisierter Formalinlösung

Fassen wir die einzelnen Befunde bei der Formalinfixierung des Lungengewebes (vgl. die einzelnen Abbildungen) zusammen, so fällt zunächst auf, daß bis auf wenige Ausnahmen das Lungengewebe des Erwachsenen auf die Formalinfixation anders reagiert, als das des Kindes. Im Vordergrund steht bei den meisten Erwachsenen eine Größenzunahme, in einigen Fällen jedoch auch eine Verkleinerung der Lungenstückchen. Bei den Säuglingen und Kleinkindern dagegen weist das Lungengewebe entweder nur eine ganz geringe Veränderung seiner Größe auf, oder aber es behält seine ursprüngliche Größe bei.

Neben der allgemein festzustellenden Veränderung der Größe sind die Ergebnisse der Versuchsreihen sehr interessant, in denen die Veränderungen des Lungengewebes in kurzen zeitlichen Abständen kontrolliert wurden. Hierbei ist es besonders bemerkenswert, daß bereits innerhalb der 1. Stunde eine z. T. recht erhebliche Größenveränderung eintritt, die sich dann wieder in Richtung auf den Anfangswert verändert, um schließlich nach etwa 4 Stunden einen neuen Größenwert zu erreichen, der im allgemeinen der endgültige bleibt.

Auf die Ursachen dieser auffälligen Beobachtungen wird im einzelnen bei der Besprechung der Wässerung des Gewebes und seiner Ergebnisse näher einzugehen sein.



Abb. 1. Versuchsreihe C. S., FERD., 68 Jahre alt, S.Nr. 45/51
Diagnose: Chronisch-substantielles Lungenemphysem. Ulcus callosum des Magens

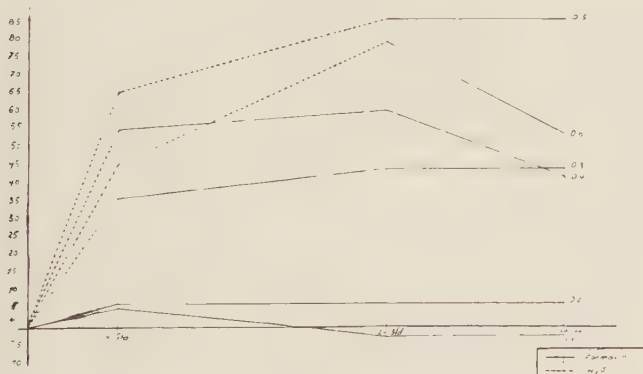


Abb. 2. Versuchsreihe D. F., FRIEDHELM, 8 Monate alt, S.Nr. 48/51
Diagnose: Lungenblähung bei Hypostase. Unspezifische Leptomeningitis

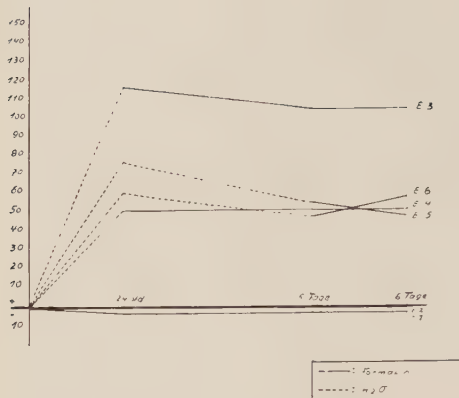


Abb. 3. Versuchsreihe E.

G., EMMA, 58 Jahre alt, S.Nr. 51/51
 Diagnose: Chronische Lungenstauung. Akute verrucöse Mitrallengocarditis

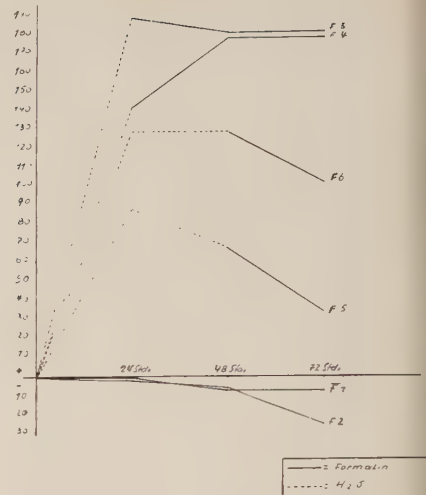


Abb. 4. Versuchsreihe F.

W., FRITZ, 69 Jahre alt, S.Nr. 63/51
 Diagnose: Chronisch-substantielles Lungenemphysem, verrucöse Mitrallengocarditis

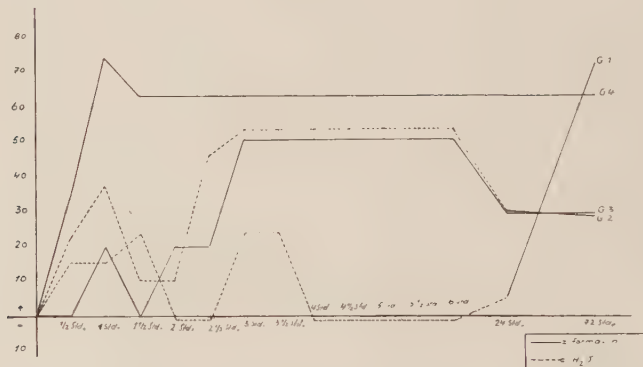


Abb. 5. Versuchsreihe G. H., Otto, 51 Jahre alt, S.Nr. 65/51

Diagnose: Hochgradiges Ödem bei Hypostase der Lungen. Zum Teil hochgradiges bullöses Lungenemphysem

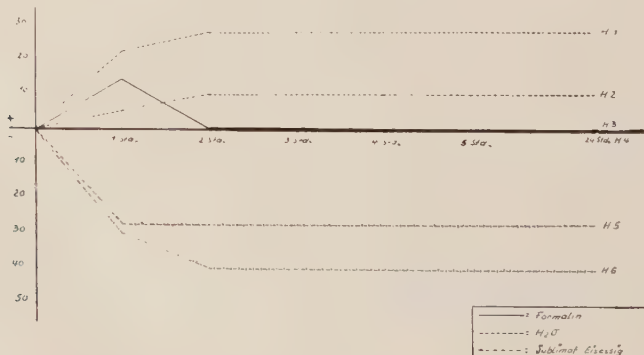


Abb. 6. Versuchsreihe H. F., EGON, 1,5 Jahre alt, S.Nr. 74/51

Diagnose: Terminales Lungenödem bei geringgradigem medialen Randemphysem

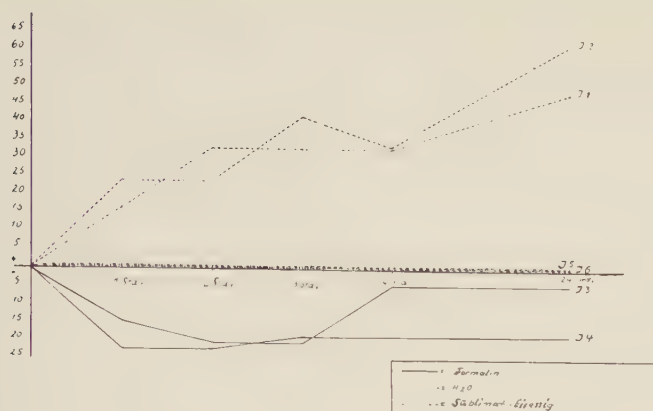


Abb. 7. Versuchsreihe J. G., GRET, 54 Jahre alt, S.Nr. 78/51
Diagnose: Chronisch-substantielles Lungenemphysem bei radiumbestrahltem Cervixcarcinom

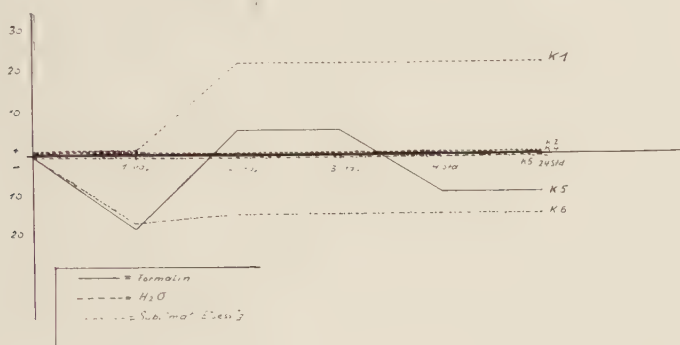


Abb. 8. Versuchsreihe K. SCH., Mädchen, 30 Minuten gelebt, S.Nr. 77/51
Diagnose: Fruchtwasseraspiration bei zum größten Teil noch nicht entfalteter Lunge

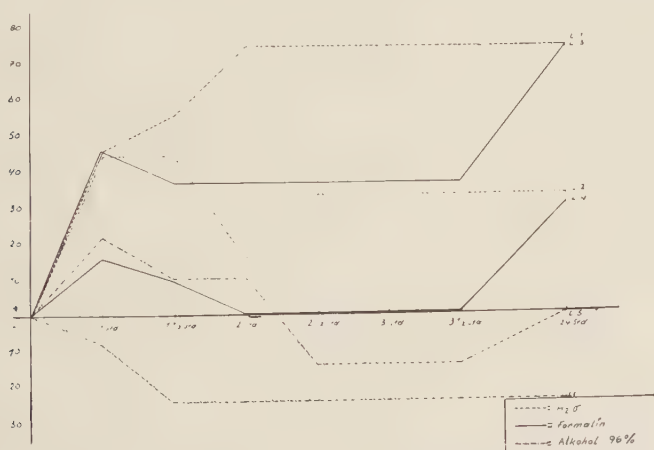


Abb. 9. Versuchsreihe L. A., ERNA, 48 Jahre alt, S.Nr. 90/51
Diagnose: Chronisch-substantielles Lungenemphysem. Schleimig-eitrige Bronchitis. Zustand nach totaler Gastrektomie

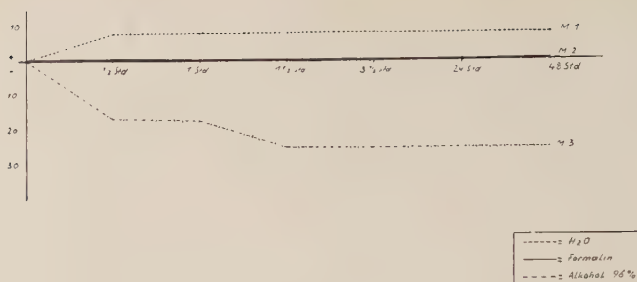


Abb. 10. Versuchsreihe M. F., Mädchen, Totgeburt Mens VII, S.Nr. 93/51
Diagnose: Totale Lungenelektase bei fetaler Erythroblastose

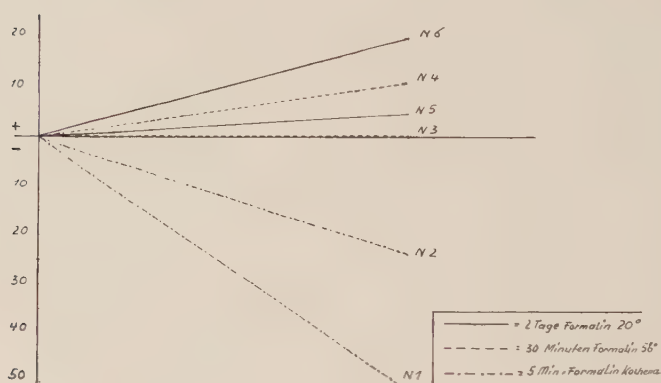


Abb. 11. Versuchsreihe N. G., GEORG, 44 Jahre alt, S.Nr. 115/51
Diagnose: Chronisches Ödem der Lungen bei chronischem Lungenemphysem

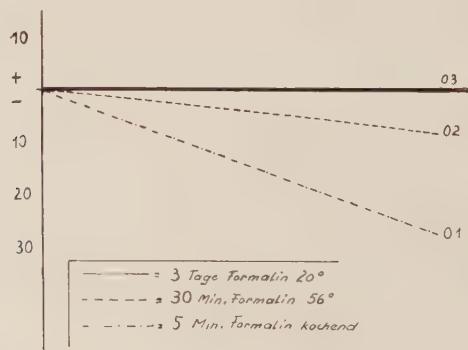


Abb. 12. Versuchsreihe O. K., KLAUS-G., Frühgeburt Mens VII, S.Nr. 116/51
Diagnose: Fetale Atelektase bei nur z. T. vorhandener unvollständiger Entfaltung der Lungen
Fruchtwasseraspiration. Beginnende Fäulnis aller Organe

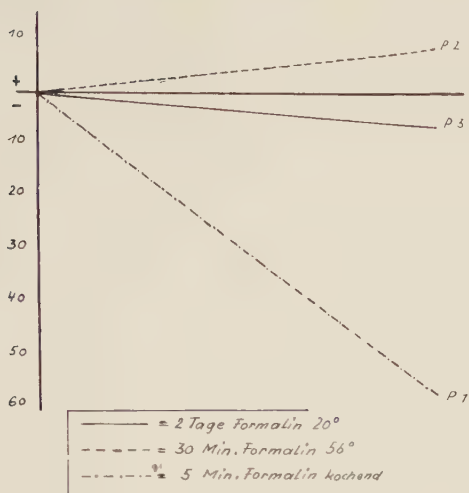


Abb. 13. Versuchssreihe P. E., Otto, 27 Jahre alt, S.Nr. 117/51
Diagnose: Ödem und Blähung beider Lungen

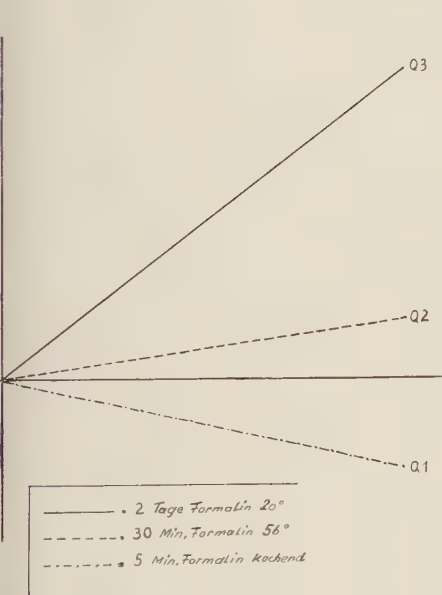


Abb. 14. Versuchssreihe Q.
SCH., HORST, 15 Jahre alt, S.Nr. 120/51
Diagnose: Fleckförmige Atelektasen

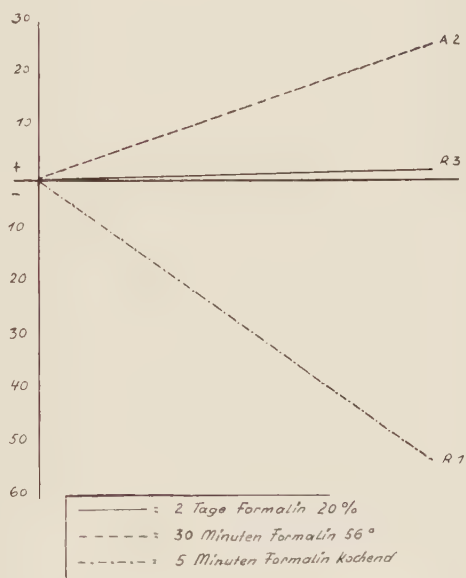


Abb. 15. Versuchssreihe R.
S., HEDWIG, 54 Jahre alt, S. Nr. 127/51
Diagnose: Fleckförmige Atelektasen

2. Die Veränderungen des Lungengewebes nach Einbringen in Leitungswasser

Fassen wir die Ergebnisse der Versuchsreihen C, D, E, F, G, H, I, K, L und M kurz zusammen, so ist die recht erhebliche Vergrößerung aller gewässerten Lungenstückchen in den ersten 24 Stunden auffällig. Wurde die Wässerung des Lungengewebes fortgesetzt, so vergrößerte sich das Lungengewebe in den meisten Fällen weiter, aber nicht mehr in dem Maße, wie in den ersten 24 Stunden. In einigen Fällen konnten wir auch eine Verkleinerung der nach 24 Stunden erreichten Größe beobachten. — Wurde das Lungengewebe nach Ablauf von 24 Stunden im Anschluß an die Wässerung in Formalinlösung eingelegt, so war in einem Teil der Untersuchungsstücke eine weitere Vergrößerung, in einem anderen aber eine geringe Verkleinerung bzw. ein Stehenbleiben auf der erreichten Größe festzustellen. Wurde die Formalinfixierung nach einer 48 Stunden währenden Wässerung vorgenommen, dann war in den meisten Fällen eine geringe Verkleinerung und nur in einigen Fällen eine geringe Vergrößerung festzustellen. Die über 5 Tage durchgeführte Wässerung des Lungengewebes ergab gegenüber dem Wert der Größenzunahme nach Ablauf der ersten 24 Stunden eine geringe Verkleinerung. In diesen Fällen veränderte die nachfolgende Formalinfixierung die Größe des Lungengewebes praktisch nicht mehr. In allen Fällen bis auf zwei Ausnahmen (vgl. die einzelnen Messungsergebnisse der Versuchsreihen G sowie L) aber waren die der Wässerung unterzogenen Lungenstückchen erheblich größer als die, die ohne jede andere Vorbehandlung mit Formalin fixiert worden waren.

Außer dieser beobachteten bedeutenden Größenzunahme, die das Lungengewebe nach Einbringen in Leitungswasser aufweist, ist die Differenz der Größenveränderungen bei den einzelnen gleichbehandelten Stücken bemerkenswert. So ergibt sich aus den als Abbildungen beigefügten Kurven, daß die Reaktion des Lungengewebes trotz gleicher Behandlung von Fall zu Fall verschieden ist. Darüber hinaus weisen sogar die Stückchen einer Versuchsreihe — und das scheint uns der auffallendste Befund zu sein — eine z. T. erhebliche Differenz ihrer Größe auf. Somit ist festzustellen, daß Teile des Lungengewebes, die makroskopisch übereinstimmende Befunde darboten und die in situ einander benachbart waren, ein z. T. völlig unterschiedliches Verhalten hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Wässerung aufweisen. Ähnliche, nur nicht so erhebliche Differenzen der Größenveränderungen konnten wir schon bei den Lungenstückchen beobachten, die ausschließlich der Formalinbehandlung unterzogen worden waren.

Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, ob die außerordentliche Differenz der Größenveränderungen nach Behandlung des Gewebes mit Leitungswasser auf Zufälligkeiten beruht, oder ob hierfür das Gewebe selbst verantwortlich gemacht werden muß. Da das Lungengewebe in jedem Fall vor Beginn des Versuchs makroskopisch genau beurteilt und mit den anderen in einer Versuchsreihe untersuchten Stückchen im Hinblick auf die Übereinstimmung der Befunde verglichen wurde und da zudem die Behandlung der in den Versuchsreihen zusammengefaßten einzelnen Teile des Lungengewebes jeweils unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Flüssigkeiten erfolgte, glauben wir die Ursache für das so auffällige verschiedene Verhalten des Gewebes nicht in Zufälligkeiten, sondern in einer evtl. vorhandenen unterschiedlichen Zusammensetzung der einzelnen Lungenstückchen auch innerhalb einer Versuchsreihe suchen zu müssen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß wir bei der Auswahl der zu untersuchenden Stückchen des Lungengewebes außer auf die Gleichheit des Aussehens auch besonders darauf geachtet haben, daß keine größeren Bronchien oder Gefäße mituntersucht wurden, die sicherlich auf

rund ihres gegenüber dem Gewebe der Lungenperipherie differenten Gewebsaufbaus diese Ergebnisse bedingt hätten. So haben wir, um der Frage einer evtl. vorhandenen unterschiedlichen Zusammensetzung des Lungengewebes nachzugehen, in Ergänzung zu den bereits erwähnten 15 Versuchsreihen nach Durchführung einiger Versuche weitere 5 Versuchsreihen angesetzt, in denen der Wassergehalt wie der Gehalt des jeweiligen Lungenstückchens an organischer und anorganischer Substanz quantitativ bestimmt wurde. Hierbei haben wir die Lungenstückchen in frischem Zustand gewogen und anschließend im Brutschrank, bzw. in der Trocknungsanlage mit Föhn bis zur Gewichtskonstanz entwässert. Die anschließende Wägung ergab im Vergleich zu der ersten Wägung in Prozentwerten den Wasserverlust des Gewebes unter der angegebenen Behandlung. Daraufhin wurde das Lungengewebe in einem sogenannten Vorwärmofen verascht und nochmals gewogen. Aus der Differenz der Werte von der zweiten und der dritten Wägung konnten den Gehalt des Lungenstückchens an organischer Substanz errechnen und mit der zweiten Wägung das Gewicht der noch vorhandenen anorganischen Substanz bestimmen. Die mit dieser Methode erzielten Untersuchungsergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

Trotz gleichen Aussehens der untersuchten Lungenstückchen war der Gehalt an Wasser sowie organischen und anorganischen Bestandteilen verschieden: So zeigte z. B. die Lunge einer 48 Jahre alten Frau mit einem Lungenödem in drei der Lungenspitze entnommenen Stücken einen Wassergehalt von 82,196%, 81,913% und von 84,21%. Der Gehalt an organischen Bestandteilen dieser drei der Lungenspitze entnommenen Stückchen betrug in derselben Reihenfolge 16,024%, 8,17% und 13,97%, die anorganische Substanz dagegen bei diesen drei Stückchen 1,48%, 1,44% und 1,82%. Bei diesen drei genannten Stückchen, die aus der Lungenspitze stammen, ist der Gehalt an organischer Substanz beim ersten Stück um 2,5% größer als bei den beiden anderen, der Wassergehalt dagegen um 2,5% niedriger. Im Vergleich hierzu weisen die beiden untersuchten Stückchen aus der Mitte des gleichen Oberlappens an organischen Bestandteilen 17,72% und 9,95% bei einem Wassergehalt von 79,71% bzw. 81,99% auf. Die anorganischen Bestandteile dieser Stückchen machten 2,57% und 2,06% des untersuchten Lungengewebes aus. Bei weiteren Untersuchungen, vor allem über den Gehalt an anorganischer Substanz der gleichen Lungen, machten wir die auffallende Feststellung, daß diese in den basal gelegenen Abschnitten des Oberlappens mit 3,73%, 3,62% und 3,89% in auffallend größerer Menge vorhanden war, als z. B. in den Teilen der Spitze desselben Oberlappens, bei denen sich ein Gehalt an anorganischer Substanz von nur 1,21% und 1,35% fand. — Ebenso auffällig, wie im vorerwähnten Fall, war auch die Untersuchung des makroskopisch normalen Oberlappens eines anderen Falles. Hierbei konnten wir einen Gehalt des Lungengewebes an anorganischer Substanz von 4,2%, 3,4%, 3,71%, 2,62% bzw. 1,82% feststellen, wobei die einzelnen untersuchten Lungenstückchen in der erwähnten Reihenfolge in situ von der Basis bis zur Spitze des Oberlappens einander benachbart waren. Auch in diesem Falle ist, wie in dem vorerwähnten, der besondere Gehalt an anorganischer Substanz in den jeweils basalen Partien eines Lappens auffällig, wobei wir außerdem feststellen konnten, daß der Gehalt an anorganischer Substanz in den untersuchten beiden Oberlappen jeweils von der Spitze zur Basis hin größer wird. Daß dieser Gehalt an anorganischer Substanz keinesfalls mit einer stärkeren Blutführung der basal gelegenen Gefäße des Lungenlappens zu erklären ist, bezeugen neben den makroskopischen Befunden die mit der gleichen Methode untersuchten Mengen an Blut von zwei Leichen. Hierbei fanden sich in dem einen Fall 0,98% und in dem anderen Fall 0,94% bzw. 0,27% und 0,49% anorganische Substanz. — Im Gegensatz zu diesen Befunden der Erwachsenen sind die Ergebnisse der vergleichsweise durchgeführten Untersuchungen an den Lungen eines 8 Monate alten Säuglings und einer Totgeburt bemerkenswert. Bei dem erstgenannten Fall wies die Lungenspitze einen Wassergehalt von 80,80% bei 17,93% organischer und 1,27% anorganischer Substanz auf. Die Basis des Oberlappens ergab einen Wassergehalt von 81,53%, 15,91% organische und 2,56% anorganische Substanz. Die Mitte des Oberlappens hatte einen Wassergehalt von 80,17% bei 13,57% organischer und 6,26% anorganischer Substanz. Die Basis des Oberlappens, und zwar ihre vorderen Anteile, wiesen 81,01% Wassergehalt bei 11,16% organischer und 4,83% anorganischer Substanz auf. Der Mittellappen in seinen vorderen Anteilen wies ab einen Wassergehalt von 78,12% bei 15,63% organischer und 6,25% anorganischer Substanz auf. Während die Basis dieses Lappens bei fast gleichem Wassergehalt mit 7,61% anorganischer Substanz und 13,67% organischer Substanz einen stärkeren Gehalt anorganischer Bestandteile aufwies, konnten der organischen erkennen ließ. Ebenso auffällig waren die Ergebnisse der anderen

untersuchten Stückchen vom Unterlappen. Hier fanden sich im Spitzenbereich des Unterlappens 76,75% Wasser, 18,20% organische und 5,05% anorganische Substanz. Auffälligerweise ergab die dorsale Partie der Unterlappenbasis bei 83,12% Wassergehalt nur 1,87% anorganische bei 15,01% organischer Substanz. Der vordere Lappenrand des Unterlappens dagegen wies einen Wassergehalt von 93,03% bei nur 0,64% organischer und 6,33% anorganischer Substanz auf. Zwei weitere Stückchen aus der Mitte des Unterlappens ergaben im dorsalen Abschnitt 78,05% Wassergehalt bei 16,34% organischer und 5,62% anorganischer Substanz, während der ventrale Teil der Unterlappenmitte und -basis 78,76% Wassergehalt bei 6,56% organischer und 8,68% anorganischer Substanz aufwies. — Eine andere sehr auffällige Beobachtung konnten wir in dem weiteren Falle einer Totgeburt machen. Hier ergab die Oberlappenspitze mit fötaler Atelektase einen Wassergehalt von 79,59% bei 10,21% organischer und 10,20% anorganischer Substanz. In Oberlappenmitte und Oberlappenbasis dagegen waren 89,30% bzw. 84,96% Wassergehalt bei 10,23% bzw. 14,26% organischer nur 0,04% bzw. 0,78% anorganischer Substanz nachweisbar. In der Unterlappenspitze fanden sich mit 6,94% anorganischer Substanz bei 7,43% organischer Substanz weit mehr anorganische Bestandteile als in der Mitte und der Basis des Unterlappens mit 0,52% bzw. 0% anorganischer bei 13,40% bzw. 12,89% anorganischer Substanz.

Somit ergibt sich zusammenfassend, daß das Lungengewebe hinsichtlich seines Gehaltes an Wasser, organischer und anorganischer Substanz in den untersuchten Stückchen überall eine verschiedene Zusammensetzung aufweist. Sehr interessant ist hierbei die Feststellung, daß in den basalen Partien der Lungenlappen die anorganischen Bestandteile in den meisten Fällen überwiegen. Lediglich bei den Säuglingslungen sind diese Befunde nicht so auffällig. Einzelheiten der dargelegten Untersuchungsbefunde sowie deren pathologisch-anatomische Bedeutung können in diesem Zusammenhang nicht näher besprochen werden.

Mit diesen dargelegten Untersuchungsbefunden, die in Ergänzung zu den 15 Versuchsreihen auf Grund besonderer Experimente gewonnen worden sind, ist der Beweis erbracht, daß die auffällige verschiedenartige Reaktion auf eine bestimmte Behandlung des Lungengewebes nicht von Zufälligkeiten abhängig ist, sondern hierfür die verschiedenartige Zusammensetzung des Lungengewebes verantwortlich gemacht werden muß. Hierbei hat sich gezeigt, daß das Lungengewebe je nach seiner topographischen Lage einen verschiedenen Aufbau zeigt und demzufolge auch auf die Behandlung mit Leitungswasser oder Formalin verschieden reagieren muß.

Neben der auffälligen Verschiedenheit der Reaktion einzelner Lungenstückchen besteht nun ein Interesse, die Größenveränderung des Lungengewebes vom Beginn der Wässerung an in kurzen zeitlichen Abständen zu verfolgen. Diese Untersuchungsbefunde erlauben zusammenfassend die Feststellung, daß 1½ Stunde nach Beginn der Wässerung eine erhebliche Vergrößerung der Stücke nachzuweisen war, die sich in den folgenden Stunden wieder verringerte, um schließlich mit einer erneuten Volumenzunahme eine Größe zu erreichen, die dann bestehen blieb.

Diese Reaktion, die bei den Lungen Erwachsener mit einem deutlichen biphasischen Kurvenverlauf („Dromedarkurve“) in die Erscheinung tritt, war bei den kindlichen Lungen nicht festzustellen. Diese wiesen, wenn überhaupt, nur eine einmalige Vergrößerung auf, die konstant blieb.

Wenngleich auch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse einige wenige Übereinstimmungen in der Reaktion des Lungengewebes auf eine bestimmte Behandlung erkennen lassen, so ist doch unter Berücksichtigung der außerordentlichen Verschiedenartigkeit der Befunde abschließend festzustellen, daß eine typische Reaktionsart des Lungengewebes nur unter gewissen Vorbehalten feststellbar ist.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage nach den Ursachen, die den beobachteten Veränderungen zugrunde liegen. Betrachten wir zunächst den Prozeß der Fixation, so ist festzustellen, daß der Sinn der Fixierung darin besteht, die „postmortalen Vorgänge hintanzuhalten und die Struktur der Gewebe in einem dem anfänglichen Zustand möglichst getreuen Abbild

„zuhalten“ (ROMEIS [8]). Obwohl man sich täglich der Fixierung als des grundlegenden Hilfsmittels zur mikroskopischen Nachprüfung makroskopisch erhobener Befunde bedient, ist bis jetzt das Wesen der Fixierung nur zu einem kleinen Teil geklärt. So betont ROMEIS [8], daß „der scheinbar so einfache Prozeß der Fixation . . . in Wirklichkeit einen sehr komplexen Vorgang“ darstellt, der „auch bei bester Technik notgedrungen mit einer mehr oder weniger eingreifenden Zustandsänderung“ der einzelnen Bestandteile des Gewebes verknüpft ist. Die Zustandsänderungen betreffen nach der heute herrschenden Lehrmeinung vor allem die Eiweißbausteine des Gewebes und bestehen in einer „Fällung der Eiweißkörper, die je nach Art und Zusammensetzung des Fixierungsmittels sehr verschieden ausfällt“ (ROMEIS [8]). Hierbei betont dieser Autor ferner GROSS und LOHAUS [3], daß das kolloidchemische Verhalten der Eiweißkörper im Organismus weitgehend von ihrer Vergesellschaftung mit anderen Stoffen, wie z. B. Lipiden, Kohlehydraten und Elektrolyten abhängig ist. So ist es sehr auffällig, daß die gebräuchlichen Fixierungsflüssigkeiten neben einer fällenden auch eine lösende Wirkung haben können, die sich auf die Eiweißkörper sowie die Fette, Lipide, Kohlehydrate und die Salze erstreckt. Es handelt sich somit bei der allgemein gebräuchlichen Fixierungsflüssigkeiten um Substanzen, die eine z. T. recht erhebliche Veränderung der verschiedenen Gewebskomponenten bedingen. Hierbei ist es nun bemerkenswert, daß diese Veränderungen der einzelnen Gewebskomponenten auch wiederum mit einer Veränderung des Volumens des Gewebes einhergehen. So betont ROMEIS [8] ausdrücklich, daß diese Veränderungen sich nicht nur an den Bauelementen abspielen, sondern auch die Gesamtgröße und die Gestalt des Präparates beeinflussen. Nach seinen Beobachtungen kommt es zumeist zu einer Schrumpfung, in anderen Fällen zu einer Quellung“. Das Ausmaß der Veränderung hierbei ist abhängig von der Art des Organs, seinem chemisch-physikalischen Zustand und von der Fixierungsflüssigkeit. Konkrete Angaben über die Veränderungen an Epithelzellen unter dem Vorgang der Fixation sowie unter der nachfolgenden Paraffineinbettung stammen von WERNER [13, 14, 15], der die hierbei auftretenden Veränderungen an der Epithelzellenauskleidung des Menstruationskanals von Meerschweinchen genau untersucht hat. Untersuchungen der ähnlichen Art, wie sie von PATTEN und PHILPOTT [7] an Schweinsembryonen gemacht worden, haben gezeigt, daß diese beiden Autoren konnten nach Fixierung in verdünntem Formol beobachten, daß das Gewebe zunächst mit einer Quellung von 5% und dann bei der Nachbehandlung mit einer Schrumpfung von 20,5% bzw. 25,5% reagiert. Da es sich hierbei aber um die Untersuchung von embryonalem Gewebe handelt, und da die Unterschiede des embryonalen Gewebes vor allem hinsichtlich des Wassergehaltes und der übrigen Bestandteile (s. auch die o. a. eigenen Befunde!) gegenüber dem Gewebe des Erwachsenen allgemein bekannt sind, glauben wir nicht, die Befunde von PATTEN und PHILPOTT auf die Organe des Erwachsenen ausdehnen zu dürfen. Wie die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungsbefunde zeigen, reagiert das Lungengewebe sowohl des Erwachsenen als auch des Säuglings bzw. Kindes auf die Formalinfixation anders als das von PATTEN und PHILPOTT untersuchte embryonale tierische Gewebe.

Neben diesen bei der Fixierung eine Rolle spielenden Faktoren sind ferner die Temperatur bei der Fixierung sowie die H-Ionenkonzentration der Fixierungsflüssigkeit und der pH-Wert des Gewebes als grundsätzlich wesentlich zu berücksichtigen. So sei beispielsweise an die Tatsache erinnert, daß sich nach Eintritt des Todes der pH-Wert des Gewebes nach der sauren Seite hin ändert und damit eine andere Reaktion des Gewebes bei der Behandlung bedingt. In Zusammenhang mit dieser Änderung des pH-Wertes steht auch eine solche der Diffusion, die ebenfalls für die vorliegende Fragestellung von Bedeutung ist. Da alle diese Gesichtspunkte an der Lunge noch nicht näher untersucht worden sind, kann an dieser Stelle hierauf nur andeutungsweise hingewiesen werden.

Um den pH-Wert des Gewebes bestimmen zu können, haben wir mehrere Versuche ausgeführt. Hierbei hat die Verwendung von Indikatorpapier der Firma „Merck“ keine brauchbaren Resultate ergeben, da die Rotfärbung der auf die Lungenschnittfläche gelegten Papierstreifen zum großen Teil durch Beimengung von Blut zur Gewebsflüssigkeit bedingt ist, die sich beim Schnitt durch das Gewebe nicht vermeiden läßt. Hierdurch war eine auch nur annähernd sichere Beurteilung des pH-Wertes des Lungengewebes nicht möglich. Die gleiche Feststellung mußten wir auch bei der Verwendung eines Farbestufometers machen, den wir mit Lungenpreßsaft füllten. Auch der Versuch, den Gewinnung von Flüssigkeit aus den Alveolen mit Mikropipetten, z. B. beim Lungenödem, zu vereinfachen, ist aus den gleichen oben erwähnten Gründen aufgegeben worden.

Betrachten wir unter diesen aufgezeigten Gesichtspunkten sowie unter Berücksichtigung unserer Untersuchungsergebnisse die sogenannte Fixierung des Gewebes kritisch, so müssen wir feststellen, daß die 10%ige Lösung des Formol keineswegs in der Lage ist, in jedem Fall die Struktur des Lungengewebes in dem Zustand zu erhalten, den dasselbe zu Beginn der Formalinbehandlung hatte. Für die Lunge ergibt sich aus unseren Untersuchungsergebnissen die Feststellung, daß das Lungengewebe infolge der Behandlung mit Formalin eine z. T. recht erhebliche Veränderung seiner Größe erfährt, so daß in diesen Fällen von „einem dem anfänglichen Zustand möglichst treuen Abbild“ (ROMEIS [8]) nicht gesprochen werden kann.

Es erhebt sich nun die Frage, warum das Lungengewebe unter einer bestimmten Behandlung sich in einigen Fällen kaum verändert, in anderen dagegen eine erhebliche Größenzunahme erfährt. Der Grund für diese unterschiedliche Reaktion ist zweifellos im Lungengewebe selbst zu suchen, wofür uns die Wässerung des Gewebes interessante Anhaltspunkte zu geben scheint.

Wie bereits mehrfach betont wurde, war die unterschiedliche Größenveränderung der einzelnen Stückchen besonders nach der Wässerung des Gewebes auffällig. Weniger ausgesprochen fand sich dieses Verhalten des Lungengewebes nach der Behandlung mit Formalin. Darüber hinaus wiesen die Stückchen, die kurze Zeit gewässert und dann erst in Formalin eingelegt wurden, zum größeren Teil eine weitere Volumenzunahme auf. Versuchen wir uns diese eigenartigen Befunde zu erklären, so scheint uns neben dem Wassergehalt des Lungengewebes selbst vor allem sein Gehalt an Eiweißkörpern und verschiedenen Salzen hierfür von Bedeutung zu sein. Ohne auf die einzelnen chemischen Besonderheiten eingehen zu wollen, sei nur betont, daß das Wasserbindungsvermögen der Eiweißkörper und Salze auch bei der Lungewässerung im vorliegenden Zusammenhang die entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die Wasseranlagerung an die Eiweißkörper ist in der Form sowohl der festen als auch der lockeren Bindung möglich und in jedem Fall zwangsläufig mit einer Volumenveränderung der Eiweißkörper verbunden, die als Quellung oder Entquellung in die Erscheinung tritt. Eine derartige Veränderung der Eiweißkörper muß wiederum zu Veränderungen der Größe und Form des Gewebes führen. Da an diesen Veränderungen der Eiweißkörper hinsichtlich der Wasserbindung zweifellos auch die Salze ebenso maßgeblich beteiligt sind, seien bei den folgenden Überlegungen die Eiweißkörper und die Salze als die substantiellen Grundlagen für die Volumenveränderungen des Gewebes bei der Wassereinwirkung zusammen als Gewebesubstanz bezeichnet.

Die von uns gemachte Erfahrung, daß das Lungengewebe sich in allen Fällen unter der Einwirkung des Wassers vergrößert hat, ist als Beweis für den Übertritt von Wasser in die Gewebesubstanz anzusehen, wofür auch die histologischen Befunde Zeugnis ablegen.

Wie die im Anschluß an die Versuche durchgeführte histologische Untersuchung ergab, sind nach der Wässerung des Gewebes regelmäßig zwei Formen der Gewebsveränderungen zu beobachten.

1. Die Aufquellung der Fasern und Zellen. Diese Erscheinungsbilder sollen in diesem Zusammenhang als Ausdruck einer festen Wasserbindung an die Gewebesubstanz aufgefaßt werden.
2. Die Verbreiterung der Gewebsspalten nach Art des Ödems. Dieses Erscheinungsbild werten wir in der vorliegenden Arbeit als lockere Bindung des Wassers an die Gewebesubstanz.

Wie bereits hervorgehoben wurde, haben wir bei der Wässerung nach $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden eine erhebliche Volumenzunahme des Gewebes festgestellt. Es ist demnach anzunehmen, daß entweder das Wasser eine derartig lange Zeit braucht, um in das Lungenstückchen einzudringen, oder sich bei schnellerem Eintritt des Wassers in das Gewebe die Gewebesubstanz dem Wasser gegenüber für die angegebene Zeit refraktär verhält. Wie aus den als Abbildungen beigelegten Kurven zu ersehen ist, kam es nach der anfänglichen erheblichen Größenzunahme zu einer Verringerung dieser Größe, auf die dann eine erneute Volumenzunahme folgte. Diese vorübergehende Schwankung des Größenwertes zum Anfangswert hin ist mit einer für kurze Zeit vorhandenen Verminderung des Wasserbindungsvermögens der Gewebesubstanz zu erklären. Als Ursache hierfür sind u. E. Umbauvorgänge innerhalb der Gewebesubstanz infolge der ohnehin schon vorhandenen und durch die Luft- und Wassereinwirkung noch stärker gewordenen Autolyse des Gewebes in Betracht zu ziehen. Als weitere Auffälligkeit bedarf der erwähnte erneute Anstieg des Größenwertes, der dann meist

erhalten bleibt, einer Erklärung. Mit der erneuten Vergrößerung des Gewebes scheint die obere Grenze des Wasserbindungsvermögens der Gewebesubstanz erreicht zu sein, da eine weitere Größenzunahme dann nicht mehr beobachtet werden konnte.

Sehr interessant bleibt in diesem Zusammenhang aber die Frage nach den Ursachen der Vergrößerung des Lungengewebes, wenn es nach kurzdauernder Wässerung in Formalin eingelegt wurde. Da wir in der Mehrzahl der Fälle unter der Einwirkung des Formalin eine weitere Vergrößerung der Stückchen beobachtet haben, scheint diese Vergrößerung nicht auf die spezifisch eiweißfällende Wirkung des Formalins, sondern auf die Wirkung des Wassers zurückzuführen zu sein. Es ist hier sehr gut vorstellbar, daß sich das Lungengewebe unter der Wässerung so stark mit Wasser vollgesogen hat, daß die Diffusion des Formalins und damit seine Einwirkung auf die Gewebesubstanz erschwert ist. Andererseits wäre es denkbar, daß nur ein Teil des in dem Lungengewebe vorhandenen Wassers an die Gewebesubstanz gebunden ist. Ferner ist die weitere Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß das Wasserbindungsvermögen der Gewebesubstanz unter den Bedingungen der Autolyse größer als das Vermögen zur Fixierung der von uns verwendeten 10%igen Formalinlösung ist, so daß das Fixierungsmittel durch eine Umwandlung der Eiweißkörper eine weitere Wasserbindung nicht verhindern kann, weil die Eiweißfällung nicht erfolgt.

Fanden wir bei der Behandlung mit Formalin im Anschluß an die kurzdauernde Wässerung noch Veränderungen des Lungengewebes, so waren diese, wie bereits hervorgehoben wurde, nicht mehr zu beobachten, wenn das Lungengewebe 5 Tage lang in Wasser und dann erst in Formalin eingelegt wurde. Dieser Befund scheint uns ein Beweis für die Annahme zu sein, daß sich die Gewebesubstanz unter der Wässerung in Verbindung mit der Autolyse so verändert, daß nach dem erwähnten Zeitpunkt eine Veränderung auch durch Formalin nicht mehr möglich ist. Ob es sich bei dieser langen Wässerung um einen Umbau der Eiweißkörper handelt, der effektiv einer Fällung der Eiweißkörper gleichzusetzen ist, oder ob die Reaktionsfähigkeit der Gewebesubstanz auf das Formalin aus Gründen der vorgeschrittenen Autolyse und ihrer Folgen erlischt, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden.

Unter Berücksichtigung des Wasserbindungsvermögens des Lungengewebes ist nun die Frage zu entscheiden, warum sich das Lungengewebe auch bei ausschließlicher Behandlung mit Formalin in vielen Fällen vergrößert? Abgesehen von den einzelnen beobachteten Schwankungen um den Anfangswert herum seien hier nur die Fälle berücksichtigt, die unter ausschließlicher Formalinbehandlung eine stärkere Größenzunahme als 10% ihres Anfangswertes erfahren haben. Auch für diese Fälle scheint das Wasserbindungsvermögen der Gewebesubstanz so groß zu sein, bzw. scheint die spezifische Wirkung der 10%igen Formalinlösung auf die Gewebesubstanz so gering zu sein, daß ein fixierender Effekt i. S. von ROMEIS [8] nicht in die Erscheinung tritt. Da auch hier die Reaktion des Lungengewebes von Fall zu Fall verschieden ist, muß für die Lunge die Existenz eines individuell verschieden großen Wasserbindungsvermögens angenommen werden, das die Verwendung einer entsprechend starken Formalinlösung erforderlich macht, um erhebliche Größenveränderungen des Lungengewebes zu vermeiden.

Es erhebt sich nun die Frage, ob das Wasserbindungsvermögen der Lunge auch vom Lebensalter abhängig ist. Wie bereits hervorgehoben wurde, ist zwischen der Lunge des Erwachsenen und der des Säuglings ein deutlicher Unterschied in der Reaktion insofern festzustellen, als die Säuglingslunge sich auf die Formalinbehandlung im allgemeinen kaum, auf die Wässerung nur gering i. S. einer Größenzunahme verändert. Die Lunge des Erwachsenen weist meist eine stärkere Volumenzunahme bei der Wässerung und eine geringere Volumenzunahme bei der Formalinbehandlung auf.

Betrachten wir unter dem Gesichtspunkt des Lebensalters unsere Befunde, so fällt auf, daß sich das Lungengewebe mit einer totalen Atelektase einer Totgeburt Mens VII (Versuchsreihe M) unter der Wässerung kaum und unter der Formalinbehandlung überhaupt nicht verändert hat. Dieser Befund ist wesentlich, da es sich um die unbeatmete Lunge bei einer fötalen Erythroblastose gehandelt hat, von der wir wissen, daß der Wasserhaushalt des Gesamtorganismus bei dieser Erkrankung in schweren und dann zum intrauterinen Tode führenden Fällen in enormem Maße verändert wird, so daß hier mit einer außerordentlich starken, die Werte des Normalen bei weitem überschreitenden Wasserbindung an die Gewebesubstanz zu rechnen ist. Bei dem weiteren Falle eines neugeborenen Kindes, das nur 30 Minuten gelebt hat und das bei der Sektion in großen Gebieten der Lunge eine fötale Atelektase neben nur geringen entfalteten Lungenpartien aufwies, die die Zeichen der Fruchtwasserrespiration boten (Versuchsreihe K), trat nach der Wässerung eine Größenzunahme des Lungengewebes um etwa 23% auf, während nach der Formalinbehandlung eine geringe Schrumpfung des Gewebes festzustellen war. Auffälligerweise veränderten sich die ausschließlich mit Wasser oder Formalin behandelten Kontrollstückchen dieses Falles überhaupt nicht.

Je weiter wir bei steigendem Lebensalter die Reaktion des Lungengewebes betrachten, um so mehr ist festzustellen, daß mit zunehmendem Lebensalter die Größenveränderung nach Wässerung und Formalinbehandlung des Lungengewebes immer stärker in die Erscheinung tritt. Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist aber keinesfalls der Schluß zu ziehen, daß die Größenveränderung infolge Wässerung oder Formalinbehandlung etwa in einem proportionalen Verhältnis zum jeweiligen Lebensalter steht. Somit läßt sich zusammenfassend zur Frage Lungenreaktion und Lebensalter nur feststellen, daß bei Säuglings- und Kinderlungen die Reaktionen bei weitem nicht so ausgesprochen sind wie bei den Lungen von Menschen in den übrigen Lebensaltern.

Nach der Besprechung der einzelnen Ergebnisse unserer Wässerungsversuche sowie ihrer Deutungsmöglichkeiten ist nun die Frage zu beantworten, ob die beobachteten individuell verschiedenen Reaktionsmodi des Lungengewebes in irgendeinem Zusammenhang zur Grundkrankheit des betreffenden Individuums stehen. Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen läßt sich unschwer ablesen, daß in den Fällen, die eine Entzündung aufgewiesen haben, die Reaktion auf die Wässerung meist eine stärkere war, als in den Fällen, deren Grundleiden kein entzündliches war. In diesen Fällen hat es sich, wie eingangs schon betont wurde, nicht um Lungen mit einer Pneumonie gehandelt, sondern um Lungen ohne pneumonischen Befund bei Entzündungen an anderen Organen. Es sei hier nur als Beispiel auf die Versuchsreihen D, L, E, C und F hingewiesen. Auffällig ist in diesen Fällen aber neben der starken Vergrößerung des Gewebes bei der Wässerung die fehlende Reaktion unter der Formalinbehandlung in den Versuchsreihen D und E, sowie die geringe Schrumpfung des Lungengewebes bei ausschließlicher Formalinbehandlung in der Versuchsreihe F.

Wie diese dargelegten Untersuchungsbefunde und ihre Deutung zeigen, eröffnet die Wässerung des Lungengewebes als Experiment in Verbindung mit vergleichsweise durchgeführten Untersuchungen der chemischen Bestandteile des Lungengewebes einige neue Perspektiven, die es vielleicht möglich machen werden, bei weiterer Prüfung der aufgeworfenen Fragen pathologisch-anatomische Befunde der Lunge und ihre lokalisatorischen Besonderheiten dem Verständnis näher zu bringen, als das in vielen Fällen heute möglich ist.

3. Die Unterschiede der Größenveränderungen des Lungengewebes nach Behandlung mit Sublimat-Eisessig oder Alkohol im Vergleich zu der Behandlung mit Formalin oder Leitungswasser

Die Ergebnisse der Versuchsreihen H, J und K, in denen das Lungengewebe mit Sublimat-Eisessig behandelt worden ist, lassen erkennen, daß unter Sublimat-Eisessig in keinem der Fälle eine Vergrößerung des Lungengewebes zu beobachten war.

In einem der Fälle veränderte die Sublimat-Eisessigbehandlung die Größe des Lungengewebes überhaupt nicht (Versuchsreihe J), in einem anderen Fall (Versuchsreihe K) blieb das eine Lungenstückchen ebenfalls unverändert, während das andere eine geringe Schrumpfung aufwies. In der Versuchsreihe H zeigten beide Stückchen eine eindeutige Schrumpfung. Dieser letztgenannte Fall war durch ein erhebliches Lungenödem ausgezeichnet, das den beiden anderen Fällen fehlte.

Somit kann abschließend festgestellt werden, daß es anscheinend der Wassergehalt des Lungengewebes ist, der infolge der Einwirkung des Sublimat-Eisessig reduziert wird, was dann mit einer Schrumpfung des Gewebes in die Erscheinung tritt.

In den beiden Versuchsreihen L und M hat die Behandlung mit 96%igem Alkohol zu einer Schrumpfung des Lungengewebes geführt.

In der Versuchsreihe L ließ das eine Stückchen nach einer anfänglichen Vergrößerung eine Verkleinerung erkennen, um dann schließlich wieder seine Anfangsgröße zu erlangen. Ähnlich wie bei der Behandlung mit Sublimat-Eisessig hat auch in der wasserreichen Lunge der Versuchsreihe M der 96%ige Alkohol eine Schrumpfung des Lungengewebes bedingt. Auffällig bleibt dagegen das Verhalten der Lunge in der Versuchsreihe L. Hier hatte sich, wie bereits im vorhergehenden Kapitel ausführlich besprochen wurde, das Wasserbindungsvermögen dieser Lunge als sehr groß gezeigt. Um so auffälliger ist es, daß das Lungengewebe auf die Behandlung mit Alkohol mit einer geringen Schrumpfung reagiert hat bzw. nach anfänglichen Schwankungen seines Größenwertes schließlich denselben Wert erreichte, der zu Beginn des Versuchs vorhanden war. Es scheint uns gerade dieser Fall ein weiterer Beweis für die im vorhergehenden Kapitel betonte Bedeutung des Wasserbindungsvermögens des Lungengewebes zu sein, da der 96%ige Alkohol in diesem Fall als hochprozentige Fixierungsflüssigkeit mit seiner besonderen Fähigkeit das Gewebe zu härten das Wasserbindungsvermögen der Lunge nicht hat in Erscheinung treten lassen, sondern zusätzlich, wie das Untersuchungsstück L 5 zeigt, dem Gewebe noch Wasser entziehen konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Behandlung des Lungengewebes mit Sublimat-Eisessig oder 96%igem Alkohol zu einem Wasserentzug des Gewebes führt, wenn ein solcher überhaupt möglich ist.

Die Schnellfixierungsverfahren des Lungengewebes im Vergleich zu der üblichen Formalinfixierung bei Zimmertemperatur

Zur beschleunigten Fixierung von Lungengewebe sind an unserem Institut zwei Verfahren gebräuchlich. Das erste Verfahren besteht in der sogenannten Kochmethode, bei der Lungenstückchen fünf Minuten lang in siedender Formalinlösung behandelt werden. Als zweite Schnellbearbeitungsmethode lassen wir die Formalinlösung dreißig Minuten lang im Brutschrank bei einer Temperatur von 56° Celsius auf das Lungengewebe einwirken. Es hat uns nun interessiert zu beobachten, wie sich das Lungengewebe unter den beiden erwähnten Behandlungsmethoden im Vergleich zu der 2 bis 3 Tage bei Zimmertemperatur durchgeführten Formalinfixierung verändert.

Fassen wir die Ergebnisse der Versuchsreihen N, O, P, Q und R zusammen, so ist die z. T. erhebliche Schrumpfung des Lungengewebes nach fünf Minuten langem Kochen in Formalin evident. In zwei Fällen hat die Behandlung mit Formalin bei Zimmertemperatur zu einer Vergrößerung des Lungenstückchens geführt (Versuchsreihen N und Q). In einem anderen Fall (Versuchsreihe O) dagegen hat sich das Lungengewebe unter der Formalineinwirkung bei Zimmertemperatur nicht verändert.

Betrachten wir nun die Größendifferenz der einzelnen Lungenstückchen einer Versuchsreihe, so ist bei zwei Fällen (Versuchsreihen O und Q) festzustellen, daß bei Zimmertemperatur mit Formalin behandeltes Lungengewebe eine stärkere Volumenzunahme als das im Brutschrank behandelte Gewebe aufwies. In den Versuchsreihen P und R hatten dagegen die im Brutschrank behandelten Lungenstückchen die höchsten Werte der Größenzunahme erlangt. Keine so auffällig unterschiedlichen Reaktionen wurden in der Versuchsreihe N gefunden, bei der die Größenzunahme der bei Zimmertemperatur und im Brutschrank behandelten Stückchen nicht wesentlich different war. Hinsichtlich der Zuordnung eines bestimmten Reaktionsmodus des Lungengewebes

zu örtlichen Befunden oder dem Lebensalter ist lediglich zu bemerken, daß die in ihrer Reaktionsart gleichenden Versuchsreihen O und Q den Lungen einer Frühgeburt und eines 15 Jahre alten Jungen entstammten.

Den dargelegten Untersuchungsbefunden ist abschließend zu entnehmen, daß die Kochmethode des Lungengewebes mit einer stärkeren Schrumpfung des Gewebes verbunden ist, die sehr wohl mit einer Veränderung pathologisch-anatomischer Befunde einhergehen kann. Es sollte daher, um wesentlichen Größenveränderungen des Lungengewebes vorzubeugen, die Fixierung kleiner Lungenstückchen bei Zimmertemperatur den beiden Schnellbearbeitungsmethoden und hier vor allem der Kochmethode vorgezogen werden.

E. Zusammensetzung

In 15 Versuchsreihen wurden die Veränderungen sowohl des normalen als auch des i. S. der Atelektase bzw. des Emphysems sowie des Ödems veränderten Lungengewebes unter der Behandlung mit 10%iger Formalinlösung, Leitungswasser, Sublimat-Eisessig und 96%igem Alkohol mittels der Methode der Größenbestimmung der Gewebstückchen untersucht.

1. Die Fixation mit 10%iger nicht neutralisierter Formalinlösung ließ bei Erwachsenen bis auf wenige Ausnahmen eine Vergrößerung der Lungenstückchen erkennen. Bei Säuglingen und Kleinkindern reagierte das Lungengewebe auf das Formalin nur in geringem Grade mit einer Größenveränderung. Bereits innerhalb der ersten Stunde der Formalinbehandlung war eine z. T. erhebliche Größenzunahme der Lungenstückchen festzustellen, auf die dann eine Verkleinerung der Stückchen in Richtung auf den Anfangswert folgte. Nach etwa vier Stunden war eine erneute Vergrößerung der Stückchen festzustellen, die im allgemeinen konstant erhalten blieb.
2. Die Wässerung des Lungengewebes hatte in den ersten 24 Stunden eine erhebliche Vergrößerung der Stückchen zur Folge. Wurde die Wässerung der Gewebstückchen fortgesetzt, so vergrößerte sich das Lungengewebe in den meisten Fällen weiter, aber nicht mehr in dem Maße, wie in den ersten 24 Stunden. Formalinbehandlung nach 24 Stunden dauernder Wässerung hatte in einem Teil der Stücke eine weitere Vergrößerung, in dem anderen Teil dagegen eine geringe Verkleinerung bzw. keine weiteren Veränderungen zur Folge. Wurde die Formalinbehandlung nach 48stündiger Wässerung vorgenommen, so war in den meisten Fällen eine geringe Verkleinerung und nur in einigen Fällen eine geringe Vergrößerung festzustellen. Formalinbehandlung nach 5 Tage dauernder Wässerung veränderte das Lungengewebe praktisch nicht mehr. Fast alle gewässerten Stücke waren erheblich größer als die nur mit Formalin behandelten.
3. Die deutliche Differenz der Größenveränderungen nach gleicher Behandlung nicht nur von Fall zu Fall, sondern auch innerhalb einer Versuchsreihe wurde auf eine verschiedenartige Zusammensetzung des Lungengewebes zurückgeführt, wofür in weiteren fünf Versuchsreihen mit quantitativer analytischer Bestimmung des Wassergehaltes sowie des Gehaltes an organischer und anorganischer Substanz der Beweis erbracht werden konnte.
4. Bei der Wässerung des Lungengewebes fand sich ebenso wie bei der Formalinbehandlung mit einer „Anfangszacke“ und einer „Endzacke“ ein biphasischer Kurvenverlauf („Dormedarkurve“). Bei kindlichen Lungen war dagegen nur eine einmalige Vergrößerung zu beobachten.
5. Als Ursache für die Vergrößerung der Lungenstückchen wird der Übertritt von Wasser mit Bindung desselben an die Eiweißkörper und Salze des Gewebes ange-

- sehen. Da auch bei Verwendung einer 10%igen Formalinlösung mehrfach Vergrößerungen der Lungenstückchen festzustellen war, wird in diesen Fällen die Konzentration dieser Lösung für zu gering gehalten, um durch die Eiweißfällung eine weitere Wasserbindung an das Gewebe zu verhindern.
6. Die Lungenreaktion war vom Lebensalter nur insofern abhängig, als die Größenveränderungen der Lungenstückchen bei Säuglingen und Kindern bei weitem nicht so erhebliche waren wie bei Erwachsenen.
 7. Hinsichtlich der Frage Lungenreaktion und Grundkrankheit konnte festgestellt werden, daß die Reaktion auf die Wässerung eine stärkere war, wenn andere Organe entzündlich verändert waren.
 8. Der Wassergehalt des Lungengewebes wurde durch Sublimat-Eisessig und durch 96%igen Alkohol vermindert, was mit einer Schrumpfung der Gewebstückchen in die Erscheinung tritt.
 9. Das 5 Minuten lange Kochen des Gewebes in Formalinlösung hatte eine starke Schrumpfung des Lungengewebes, die Formalinbehandlung während 30 Minuten im Brutschrank bei 56° Celsius eine geringe Schrumpfung zur Folge.

Schrifttum

- 1) BENDIEN und GANS: Ztschr. f. wiss. Mikroskop. **44**, 309 (1927).
- 2) BERG: „Die Fehlergröße bei den histologischen Methoden“. A. Hirschwald-Berlin (1908).
- 3) GROSS und LOHAUS: Ztschr. f. wiss. Mikroskop. **49**, 168 (1932).
- 4) LOESCHCKE in HENKE-LUBARSCH: Hdb. d. spez. path. Anat. u. Hist. **3**, I, Berlin 1928.
- 5) v. MÖLLENDORFF: Aschoff-Vorlesung am 13. 1. 1942. Freiburger Med. Ges., Reihe II, H. 1 Verlag: H. F. Schulz 1942.
- 6) NISSEL: „Nervensystem“ in Krauses Enzyklopädie der mikroskop. Technik. 2. Aufl. Wien und Berlin 1910, S. 268.
- 7) PATTEN und PHILPOTT: zit. nach ROMEIS.
- 8) ROMEIS: „Mikroskop. Technik“, München, Leibniz-Verl. 1948.
- 9) SCHÖNBERG: Vierteljahresschrift f. gerichtl. Med. u. öff. San.-Wesen **52**, 1, 17 (1916).
- 10) SPATZ: Verhdlg. d. path. Ges. **18**, 222 (1921).
- 11) TELLYESNICZKY: Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsgesch. **52**, 202 (1898).
- 12) WERNER: Ztschr. f. Zellforschung u. mikroskop. Anat. **16**, 471 (1932).
- 13) WERNER: Ztschr. f. Zellforschg. u. mikroskop. Anat. **20**, 747 (1933).
- 14) WERNER: Ztschr. f. wiss. Mikroskop. **52**, 406 (1935).
- 15) WERNER: Ztschr. f. wiss. Mikroskop. **53**, 440 (1930).
- 16) ZEIGER: „Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik“. Dresden und Leipzig: Th. Steinkopff 1938.

[Eingegangen am 2. Dezember 1952]

Zur Entwicklung des Binokularmikroskops

Von C. H. Claussen (Wetzlar)

Mit 9 Abbildungen

Das binokulare Mikroskopieren ist heute eine Selbstverständlichkeit, und kein Mikroskopiker, der täglich viele Stunden am Mikroskop sitzt, möchte seinen binokularen Tubus oder binokularen Tubusaufsatz missen.

Ende 1953 sind es gerade 40 Jahre her, daß die ersten Leitz-Mikroskope mit Binokulartuben gefertigt wurden. Von hier aus haben diese Binokularmikroskope ihren Siegeszug durch die ganze Welt angetreten und werden jetzt von fast allen Firmen in der damals gefundenen Form hergestellt.

Der Wunsch, mit einem Mikroskop ebenso beidäugig zu beobachten wie beim normalen Sehen, ist wohl so alt wie die Mikroskopie selbst. Nach sehr frühen Anfängen (CHERUBIN D'ORLÉANS 1677, ZAHN 1701) schiefen die Versuche zur Herstellung binokularer Mikroskope wieder ein. Erst nach den bekannten Arbeiten WHEATSTONEs über das stereoskopische Sehen Mitte des 19. Jahrhunderts wurden sie in größerem Umfange wieder aufgenommen. Von den zahllosen damaligen Konstruktionen mit einem und mit zwei Objektiven hat sich bis heute nur das Greenoughsche Mikroskop (1897) durchsetzen können. Bei diesem Gerät sind die optischen Achsen der beiden Objektive etwa 14° gegeneinander geneigt. Das bedingt (s. Abb. 1), daß der maximale Öffnungswinkel eines Objektivs kleiner als 14° und die zugehörige

Apertur kleiner als $A = \sin \frac{14^\circ}{2} \approx 0,12$ sein muß. Mikroskope mit zwei Objektiven

sind infolge dieser Aperturbegrenzung nur für geringe Vergrößerungen zu verwenden. Will man hohe Vergrößerungen erreichen, so muß man Mikroskope mit nur einem Objektiv (hoher Apertur) benutzen und die Strahlenbüschel hinter dem Objektiv entweder geometrisch (Abb. 2) oder physikalisch (Abb. 3) aufteilen.

Nimmt man die geometrische Teilung in oder nahe bei der Austrittspupille der Objektive vor, so erhält man zwei Büschel mit deutlich verschiedener Neigung und einen stereoskopischen Effekt. Doch ist diese Austrittspupille nur bei schwachen Objektiven zugänglich. In England wurden die Stative eine Zeitlang mit Binokulartuben der verschiedensten Arten ausgerüstet (Abb. 4). Im allgemeinen war bei ihnen der Strahlenteiler ausschaltbar, sodaß sie auch als monokulare Instrumente verwandt werden konnten. Dies war notwendig, weil man für die binokulare Beobachtung nur schwache Objektive gebrauchen konnte, weil die Bilder sehr verschiedene Helligkeit besaßen und von geringer Qualität waren.

Einen bedeutenden Fortschritt bezüglich der Bildqualität brachte das stereoskopische Okular von ABBE (1880), das allerdings für die beiden verschiedenen Tuben verschiedene Okulare benötigte und bei dem sich die Helligkeit der beiden Bilder wie 2 : 1 verhielt (Abb. 5). Das Okular lieferte zwei gleiche Bilder, und der Stereo-

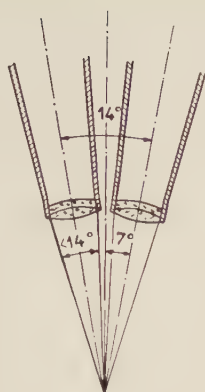


Abb. 1

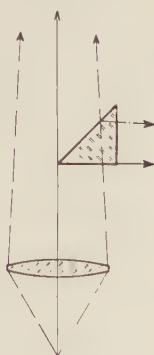


Abb. 2

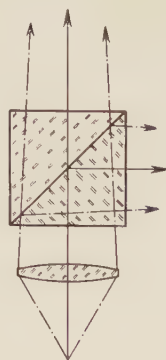
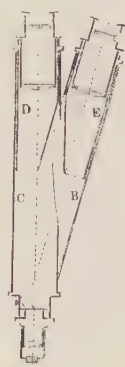
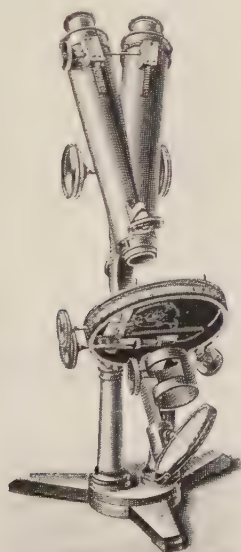


Abb. 3

b. 1. Die maximale Apertur der Objektive im Greenough-Mikroskop wird durch die Neigung ihrer optischen Achsen gegeneinander bestimmt

b. 2. Geometrische Strahlenteilung. Das Bündel wird durch eine Spiegelfläche in zwei geometrisch gleiche Teile aufgespalten. Beide Teilbündel haben keinen Strahl gemeinsam. Zur optischen Achse schiefe Bündel werden nur dann in geometrisch gleiche Teile aufgespalten, wenn der Strahlenteiler an der Stelle des größten Bündelquerschnittes (Pupille) sitzt

b. 3. Physikalische Strahlenteilung. Jeder einzelne Strahl des Bündels wird an einer durchlässigen Spiegelfläche in zwei gleiche Teile aufgespalten. Beide Teilbündel enthalten gleiche Strahlen und sind gleich. — Zur optischen Achse schiefe Bündel werden unabhängig vom Ort, an dem der Strahlenteiler sitzt, ebenfalls in zwei einander gleiche Teilbündel aufgespalten



b. 4. Binokulares Mikroskop von Beck mit geometrischer Strahlenteilung (nach DIPPEL 1882)

effekt wurde durch Halbblenden in den Austrittspupillen der Okulare erzeugt. Auch dieses Okular, das als Tubusaufsatz verwandt wurde, konnte sich nicht durchsetzen.

Der stereoskopische Effekt ist bei starken Vergrößerungen sehr gering. Das ist leicht einzusehen, wenn man bedenkt, daß die Tiefenschärfe starker Objektive äußerst klein ist.

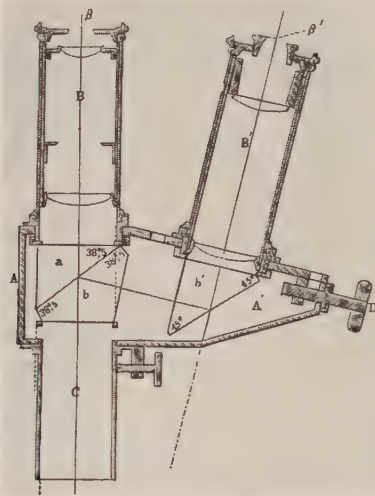


Abb. 5. Stereookular von ABBE (1880) mit physikalischer Strahlenteilung an einem Luftspalt zwischen zwei Glasprismen (nach ABBE, Ges. Abh. Bd. I 1904)

Tiefe des mikroskopischen Bildes für $n_{\text{Obj}} = 1,45$ und $\lambda = 0,555\mu$

Objektiv	Tubusfaktor	Okular	Okulares Sehfeld	Gesamt-Vergrößerung	Tiefenschärfe bei		Größe des Sehfeldes im Objekt	Verhältnis der Tiefenschärfe bei akkomm. Auge zur Größe des Sehfeldes
					nicht akkomm. Auge	akkomm. Auge		
2,5/0,05	1,25	H 8 ×	15,0	25 ×	556 μ	1136 μ	4800 μ	1 : 4
6/0,18	1,25	H 6 ×	16,7	45 ×	73 μ	252 μ	2230 μ	1 : 9
10/0,25	1,25	H 8 ×	15,0	100 ×	27 μ	63 μ	1200 μ	1 : 19
25/0,50	1,25	P 8 ×	16,0	250 ×	5,6 μ	11,4 μ	540 μ	1 : 47
45/0,65	1,25	P 8 ×	16,0	450 ×	2,6 μ	4,6 μ	284 μ	1 : 62
100/1,30	1,25	P 8 ×	16,0	1000 ×	0,62 μ	0,98 μ	128 μ	1 : 130

In der Tabelle ist die Tiefenschärfe (nach BEREK) für einige gebräuchliche Vergrößerungen und die dafür üblichen Objektiv-Okular-Kombinationen zusammengestellt. Da man häufig ganz unbewußt die Akkommodationsfähigkeit des Auges ausnutzt, ist sowohl die Tiefe des scharf abgebildeten Objektes bei unbewegtem wie bei einem von unendlich bis auf 25 cm Entfernung akkommodierenden Auge angegeben. Für den letzteren Fall ist außerdem das Verhältnis von übersehbarer Tiefe zum übersehbaren Objektdurchmesser angegeben.

Während bei 25facher Vergrößerung das Verhältnis von Tiefe zu Durchmesser des scharf abgebildeten Objektes wie 1:4 ist, sinkt es bei 1000facher Vergrößerung auf 1:130. Es erscheint nur noch ein ganz flacher Schnitt von 0,6 bzw. 1,0 μ durch das Objekt scharf, und nur durch Betätigung der Mikrometerschraube kann man die Objekte in allen Einzelheiten scharf sehen und einen Eindruck von ihrer räumlichen Ordnung bekommen. Dies ist der wesentliche Grund dafür, daß sich alle stereoskopischen Binokulartuben nicht durchsetzen können.

Die Tatsache, daß das stereoskopische Sehen bei hohen Vergrößerungen nur gegen Nutzen brachte und die geringe Qualität aller vorhandenen binokularen Tuben veranlaßte J. AMANN 1910 unter Verzicht auf stereoskopische Wirkung der Binokulartuben zu der Forderung: „die vorzüglichen optischen Institute des Kontinents wendeten sich zur Aufgabe stellen, diesen wichtigen Fortschritt in der Mikroskopkonstruktion zu realisieren: eine praktische binokulare Vorrichtung, welche erlaube, gleichzeitig und in normaler Weise mit beiden Augen zu mikroskopieren, ohne dadurch im Gebrauche der heutigen optischen Hilfsmittel in irgendwelcher Weise eingeschränkt zu sein.“

Die Erfüllung dieses Wunsches gelang dem heutigen Seniorchef der Leitzwerke, der erkannte, daß ein für einen anderen Zweck schon mehrfach verwandtes Prismensystem mit physikalischer Strahlenteilung hier hervorragend geeignet war. Die ersten Versuche wurden in den Jahren 1909/1910 gemacht.

Nach sorgfältigen Vorbereitungen wurde das erste binokulare Mikroskop dann fertiggestellt. F. JENTZSCH, ein wissenschaftlicher Mitarbeiter der Leitzwerke, erwarb sich besondere Verdienste um die Erprobung dieses Instrumentes und betonte es besonders im Hinblick auf die physiologische und hygienische Bedeutung des binokularen Sehens noch im selben Jahr in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie. Abbildung 6 zeigt das Mikroskop in der damaligen Form mit geradem Binokulartubus.

Der innere Aufbau des Tubus ist aus Abb. 7 ersichtlich. Das vom Objektiv kommende Lichtbündel wird in dem verkitteten Prisma an der teildurchlässig verspiegelten Fläche *D* in zwei gleiche und gleichhelle Teile aufgespalten. Die beiden seitlichen Prismen sind mit den Okularstutzen verbunden. Sie haben verschiedene Längen, um die unterschiedlichen Lichtwege, die die abbildenden Bündel im Teilungsprisma zurücklegen, zu kompensieren. Hierdurch sind die beiden Zwischenbilder gleich groß, und sie liegen in gleicher Höhe. Dadurch ist es möglich, in beiden Tuben gleiche Okulare zu verwenden.

Die Okularstutzen lassen sich symmetrisch zur Achse des Mikroskops auf Augenabstände von 54 bis 75 mm einstellen. Während die geringen Fehler in der Tubuslänge, die hierbei auftreten, für die subjektive Beobachtung keine Rolle spielen, ist es notwendig, eines der Tubusrohre in seiner Länge verstellbar zu machen, um Augenunterschiede zu kompensieren.

Abbildung 8 zeigt den Prismensatz, wie er im Binokulartubus mit Schrägeinblick verwandt wird. Ein derartiger Tubus ermöglicht eine wesentlich bequemere Kopfhaltung beim Mikroskopieren und erlaubt es, die Mikroskope mit horizontal stehendem Okular zu verwenden, was besonders beim Arbeiten mit Flüssigkeiten von großem Vorteil ist.

Beim Mikroskopieren sollen die Augen in die Ferne, nach Unendlich, blicken. Infolgedessen stehen die Augenachsen parallel. So müssen auch die Okularrohre parallel gerichtet sein. Sobald der Abstand der Okulare dem der Augen entspricht, sehen beide Augen die gleichen Bilder, die mühelos miteinander verschmelzen. Es ist deshalb wichtig, den Abstand der Okularrohre genau einzustellen und mit entspann-

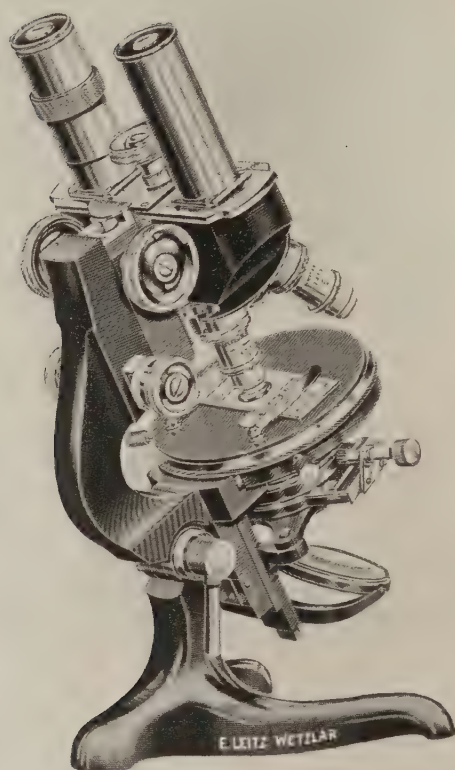


Abb. 6. Erstes Binokularmikroskop von Leitz (1913) mit physikalischer Strahlenteilung an einer teildurchlässigen Silberschicht und symmetrischem Strahlengang

ten, in die Ferne blickenden Augen zu beobachten. Da die beiden Bilder identisch sind, kann kein stereoskopischer Effekt entstehen, und trotzdem erscheint das binokulare Bild wesentlich anders als das nur mit einem Auge gesehene. Es wirkt lebhafter und inhaltsreicher. Dieser Eindruck entsteht vermutlich dadurch, daß die Eigenschaften beider Augen gleichzeitig benutzt werden und beide Netzhäute mit ihren Sehorganen und den mit ihnen gekoppelten Nerven und Zentren im Gehirn in Tätigkeit sind. Beide Augen sind zumeist bezüglich der Farb- und Helligkeitsempfindung und der Schärfe verschieden. Daher bedeutet das binokulare Mikroskopieren ein gleichzeitiges Ausnutzen der guten Eigenschaften beider Augen.

Wer gewohnt ist, einäugig zu mikroskopieren, glaubt, daß es keine Mühe mache, das im nichtbenutzten Auge entstehende Bild zu unterdrücken. Er wird sich seines Irrtums erst bewußt, wenn er beim binokularen Mikroskopieren auch dem zweiten Auge dasselbe Bild darbietet und er dieses Bild nicht mehr unterdrücken muß, sondern der bewußten Wahrnehmung zuführen darf. Er wird erstaunt sein, wieviel geringer die Anstrengung des Mikroskopierens ist, ganz zu schweigen von den Augen-

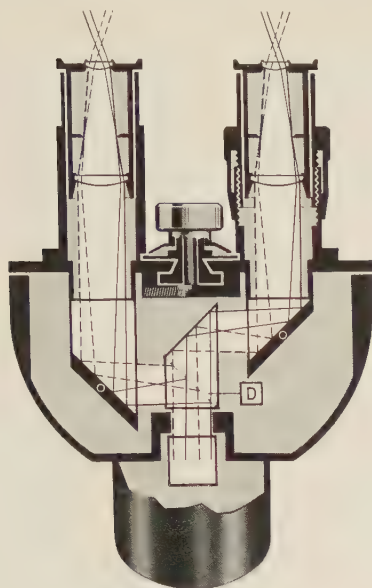


Abb. 7. Leitzscher Binokulartubus im Schnitt (D: Strahlenteilerfläche)

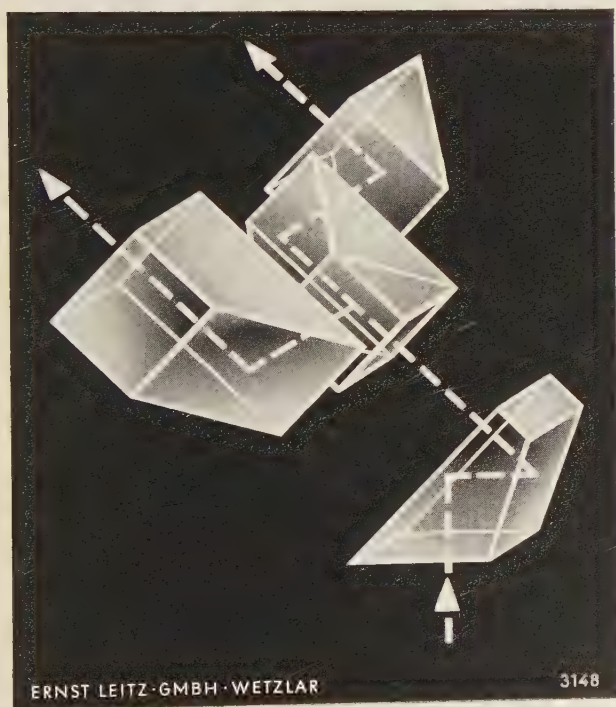


Abb. 8. Prismensatz des Leitzschen binokularen Schrägtubus

schädigungen, die im Laufe der Jahre dadurch entstehen, daß die meisten Mikroskopiker beim monokularen Mikroskopieren nicht beide Augen abwechselnd benutzen, sondern stets mit ein und demselben Auge beobachten.

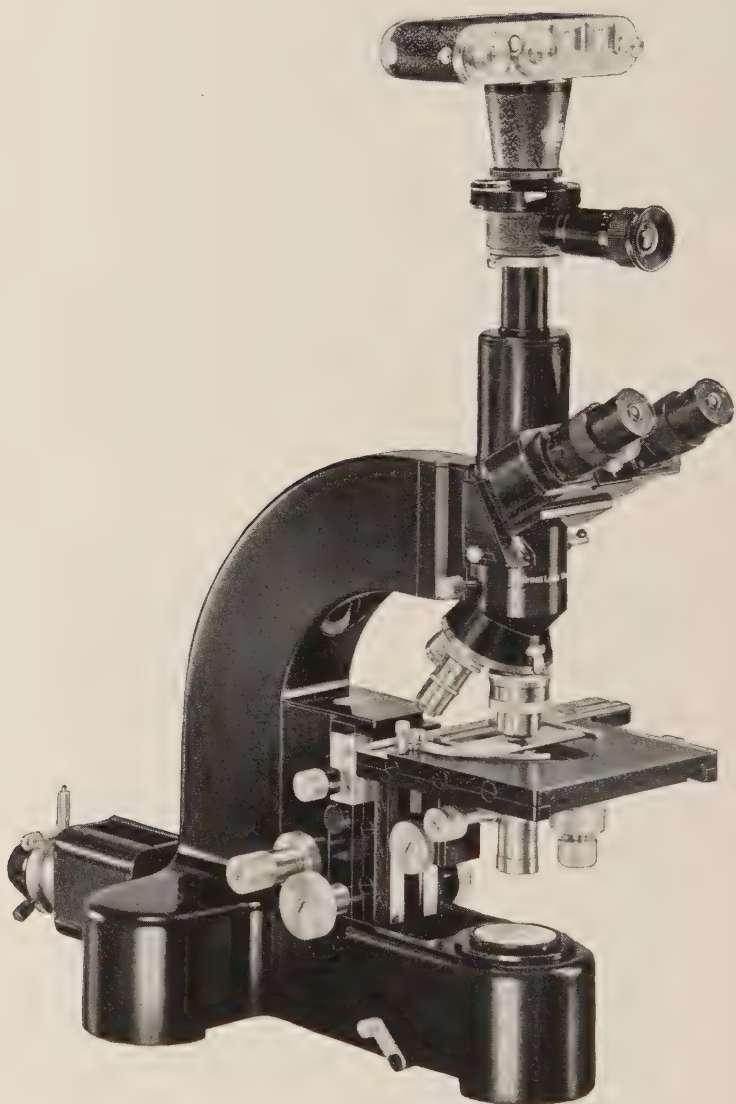


Abb. 9. Modernes Forschungsmikroskop

Mit einem kleinen Trick kann man das Binokularmikroskop als Stereomikroskop verwenden. Bei richtiger Einstellung des Okularabstandes sollen die Austrittspupillen der Okulare genau in die Augenirise fallen. Diese Austrittspupillen sind die Bilder der Objektivöffnung, die kurz oberhalb der Augenlinsen der Okulare entstehen. Durch Abdecken der halben Pupillen in der Weise, daß man bei einer die rechte

der anderen die linke Hälfte abdeckt, erreicht man es, daß man mit einem Auge durch die linke, mit dem anderen nur durch die rechte Hälfte des Objektives sieht. In diesen Fällen sind die beiden abbildenden Büschel gegeneinander geneigt und die Bilder, die den beiden Augen geboten werden, nicht mehr gleich. Das Objekt erscheint stereoskopisch. Das Abdecken der halben Austrittspupillen geschieht am einfachsten durch den Rand der Augeniris. Man hat nur den Augenabstand viel zu klein einzustellen, daß die halben Austrittspupillen von der Iris abgedeckt werden und mit parallel stehenden Augenachsen zu beobachten, dann sieht man das Bild orthoskopisch, während zu großer Okularabstand zu pseudoskopischen Bildern führt. Nach dem oben Gesagten sind diese Effekte nur bei schwachen Vergrößerungen möglich.

Für polarisationsoptische Arbeiten ist ein Binokulartubus mit physikalischer Strahlenteilung nicht ohne weiteres verwendbar. Das durch die Teilungsfläche hindurchtretende Licht wird nämlich senkrecht zu dem an der Fläche reflektierten Licht polarisiert. Das bedeutet aber, daß die beiden Bilder im Binokulartubus kreuzweise zueinander polarisiert sind. Dies ist normalerweise nicht sichtbar, denn vorhandene Unterschiede in den beiden Bildern werden nur dann auftreten, wenn man zusätzlich mit Polarisator und Binokulartubus (als Analysator) arbeitet, nicht aber, wenn man den Analysator stets eingeschaltet läßt und den Polarisator ein- und ausklopft, wie dies zum Beispiel bei dem Leitzschen binokularen Polarisationsmikroskop OPOL der Fall ist.

Durch einen geringfügigen Umbau des Prismensystems und Einführung von Interferenzschichten gelang es in den letzten Jahren, die beiden Bilder des Binokulartubus kreuzweise polarisationsoptisch völlig gleich zu machen. So ist in absehbarer Zeit zu erwarten, daß sich der Binokulartubus in der Polarisationsmikroskopie ebenso einfügen wird wie in allen übrigen Zweigen der Mikroskopie.

Die Helligkeit der binokularen Bilder ist der Strahlenteilung wegen geringer als die in monokularen Mikroskopen. Man verwendet deshalb ausreichend helle Lichtquellen, die für die Mikroskopie zur Verfügung stehen und in modernen Forschungsmikroskopen zumeist eingebaut sind. Ein solches Gerät mit universeller Verwendbarkeit für Hellfeld-, Dunkelfeld- und Phasenkontrastbeobachtung im Durchlicht und für Hellfeld- und Dunkelfeldbeobachtung im Auflicht, das heute ohne die Möglichkeit monokularer Beobachtung nicht mehr zu denken ist, zeigt die Abbildung 9.

[Eingegangen am 2. 11. 1953]

Kleine Original-Mitteilungen

Hirschler, Jan †, Eine praktische Einrichtung zum Anfertigen von Feulgen-Präparaten. — Eingegangen am 3. II. 1953.

Wie die FEULGEN-Färbung auszuführen ist, ist in dem bekannten Taschenbuch von ROMEIS angegeben. Ich hielt mich auch zuerst streng an die dort enthaltenen Weisungen. Nicht lange hernach kam ich aber zur Überzeugung, daß man dieses Verfahren recht bedeutend vereinfachen kann, ohne ihm seine Exaktheit zu nehmen, ja vielleicht im Gegenteil diese in einem gewissen Sinne eher zu heben.

Es hat sich nämlich herausgestellt, daß man die fuchsinschwefliche Säure monatelang unverändert in Behältern aus weißem Glas aufbewahren kann, wenn diese nur genügend dicht verschlossen sind, ohne daß es notwendig wäre, dunkles Glas dazu zu verwenden, wie das ROMEIS empfiehlt. Von dieser Tatsache ausgehend habe ich die Nuclealfärbung auf folgende Weise ausgeführt: Die fuchsinschwefliche Säure und die drei Bäder, die der Färbung folgen, wurden in je einem Zylindergefäß aus weißem Glas mit eingeschlifffenem Stöpsel gehalten. Diese Zylinder wurden zuvor mit feinstem Vaseline abgedichtet, indem der trockene Schliff des Zylinders mit einer nicht zu dünnen Schicht Vaseline bedeckt wurde. Die Höhe der Zylinder wurde so gewählt, daß man an ihnen, bei geschlossenem Gefäß, normale Objektträger senkrecht aufstellen konnte. Ihrer Breite nach waren die Zylinder so geräumig, daß man drei Objektträger nebeneinander an ihre Wand anlehnen konnte. Das Anlehnen der Objektträger mit ihren Rückenseiten aneinander war nämlich zu vermeiden, um ein rasches Arbeiten, worauf es sehr ankommt, zu ermöglichen.

Beim Einlegen der Präparate in die Lösungen und bei ihrem Herausnehmen hatte ich unter der Hand einen weißen Papierbogen, auf den die mit Vaseline beschmierten Glasstöpsel gelegt wurden und der sonst staubfrei in einer flachen Schachtel gehalten wurde, um das Vaseline, nach längerem Gebrauch der Zylinder, nicht zu verunreinigen und die Dichte des Glasverschlusses dadurch nicht zu gefährden.

Es kommt also bei dieser Einrichtung vor allem darauf an, die Präparate in die Gefäße mit den Lösungen möglichst schnell mit einer Pinzette einzustellen und sie aus ihnen wiederum schnell herauszunehmen, denn ein längeres Offenhalten der fuchsinschweflichen Säure und der Bäder würde bald diese Lösungen unbrauchbar machen.

Aus diesem Grunde gebrauche ich auch Zylindergläser, in die man drei und nicht mehr Objektträger gleichzeitig hineinstellen kann, denn würde man breitere Gläser gebrauchen, um in ihnen mehr Objektträger unterzubringen, so müßte das mehr Zeit einnehmen und die Lösungen würden in einer kürzeren Zeit verderben. Geht es also darum, gleichzeitig mehr wie drei Präparate zu färben, so ist es praktisch, eine parallele Zylindergarnitur zu gebrauchen.

Beim Einhalten der angegebenen Maßregeln konnte ich über drei Monate sowohl die fuchsinschwefliche Säure wie auch die Bäder in gebrauchsfähigem Zustande behalten.

Die Vorzüge dieses Verfahrens dem bei ROMEIS angegebenen gegenüber sind folgende: Man geht viel sparsamer mit den Reagentien vor, man gebraucht weniger Laboratoriumsglas und es fällt das zeitraubende Putzen der gebrauchten Gefäße nach jeder Färbung weg. Es wird also nicht nur Material, sondern, was noch wichtiger ist, Zeit gespart.

Bezüglich der Hydrolyse in einem warmen Salzsäurebad habe ich folgende Erfahrung gemacht. Nimmt man, wie das ROMERS empfiehlt, die Hydrolyse über einer Gasflamme in einem offenen Kochglase vor, so verdunstet nach seinen Angaben mit der Zeit das Wasser und deswegen muß es in gewissen Zeitabständen bis zu einer gewissen Marke nachgefüllt werden, um die vorgeschriebene Salzsäurekonzentration nicht zu überschreiten. Arbeitet man auf diese Weise einige Tage mit derselben Salzsäurelösung, so bemerkt man, daß die Hydrolyse sich allmählich nach derselben Zeitspanne schwächer auswirkt, was sich aus der schwächeren Färbung des Präparates mit fuchsinschwefliger Säure ergibt (notabene nach derselben Vorbehandlung). Nachdem ich darauf gekommen bin, habe ich die Hydrolyse nur in einem mit Vaseline abgedichteten Glaszylinder im Thermostaten bei 25° C während 24 Stunden vorgenommen. Bei dieser Handhabung ist die Auswirkung der Hydrolyse eine schonendere und, was auch nicht unwichtig ist, eine exaktere. Aus diesem Grunde ist der größere Zeitverlust gerne in Kauf zu nehmen.

Berichtigung

Berichtigung der Arbeit: Th. v. Hirsch, München, „Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte“ aus Heft 6, 61. Band, Seite 339:

„In Abb. 1 auf Seite 339 fehlen die Zahlen, welche den Brechungsindex des Einschlußmediums angeben. In der Reihenfolge von links nach rechts sind folgende Werte einzusetzen: 1.33, 1.43, 1.50, 1.51, 1.52, 1.53, 1.54, 1.55, 1.56, 1.57, 1.58, 1.59, 1.63, 1.74.“

Referate

Falkenhagen, H., Die Naturwissenschaft in Lebensbildern großer Forscher. Stuttgart (S. Hirzel) 1948. 224 Seiten, Gzlwd. DM 10,—.

An einen weiteren Kreis sich wendend, bringt Verf. kurze Darstellungen von Leben und Werk großer Naturforscher vorwiegend physikalischer Arbeitsrichtung. Nach einigen Angaben betr. Altertum behandelt er die Naturforscher der neueren Zeit, aufgegliedert in solche allgemeiner und spezieller Richtung und zwar die letzten geordnet nach den Teilgebieten der Physik. So finden sich im ganzen 107 Lebensbilder, innerhalb deren aber noch weitere Forscher genannt werden, so daß das Namenverzeichnis gegen 350 umfaßt. Das Buch bildet einerseits eine erwünschte Ergänzung zu jenen Lehrbüchern der Physik, in denen historische Angaben nur auf Geburts- und Todesdaten sich beschränken, und dürfte dazu beitragen, das leider sehr geringe historische Interesse beim Studenten zu wecken; aber es wird allen willkommen sein, die an der Geschichte der Naturwissenschaften Anteil nehmen; und zu diesen gehört hinsichtlich der großen Optiker auch der Mikroskopiker. Die Angabe einiger Quellen wäre erwünscht gewesen.

W. J. Schmidt (Gießen)

Falkenhagen, H., Grundlagen der Theoretischen Physik. Optik. Stuttgart (S. Hirzel) 1949. 186 S., geb. Hlwd. DM 9.—

Das Buch stellt den ersten Teil der „Grundlagen der theoretischen Physik“ des Verf. dar, behandelt die elektromagnetischen Wellen, dann Reflexion und Brechung, Metalloptik, Kristalloptik, Interferenz und Beugung, Dispersion und Absorption, Grundlagen der Elektronentheorie, Elektrodynamik und Optik bewegter Körper und schließlich die Geometrische Optik. In einem Ergänzungsband sollen noch speziellere Fragen wie Lichtstreuung, Magneto- und Elektrooptische Erscheinungen behandelt werden. Da der mathematische Aufwand sich auf Differential- und Integralrechnung und Vektoranalyse beschränkt, dürfte das in erster Linie für den Studenten bestimmte Werk für jeden an der Optik Interessierten, der etwas mit der Mathematik vertraut ist, ein zuverlässiger Ratgeber für strenge Ableitung des einschlägigen Gesetze sein.

W. J. Schmidt (Gießen)

Freund, H., Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Band II: Mikroskopie der Bodenschätze. Teil I: Mikroskopie der Steinkohle, des Kokes und der Braunkohle. Mit 589 Mikro-Aufnahmen, Zeichnungen und Porträts sowie 32 farbigen Mikro-Aufnahmen. Frankfurt/Main (Umschau-Verlag) 1952, LXII u. 759 Abb., Preis gebunden DM 185.

Nach einem Geleitwort der deutschen Kohlenbergbau-Leitung gibt STACH eine „Geschichte der Kohlenmikroskopie“, die 1830 mit LINDLEY beginnt, der unter Lupe oder Mikroskop Kohlenanschliffe bei Schrägbeleuchtung durch eine Linse untersuchte und die pflanzliche Natur erkannte. Es ist bemerkenswert, wie innig die fortschreitende Einsicht auf diesem Gebiet an die Verbesserung der Untersuchungstechnik (Dünnschnitt, -schliff, -anschliff, morphologische und chemische Prüfung unter dem Mikroskop, neuestens auch elektronen- und phasenmikroskopische) geknüpft erscheint und wie diese Forschungen schließlich ein eigenes Institut im Ruhr-

gebiet erhielten. Botaniker, Palaeobotaniker, Geologen, Chemiker und Mineralogen haben auf diesem Gebiete höchst erfolgreich zusammengewirkt. KÜHLWEIN und HOFFMANN bearbeiteten „Petrographie und Mikroskopie der Steinkohle in Wissenschaft und Praxis“ und zwar die Grundlagen der Petrographie und Mikroskopie der Steinkohle und die angewandte Steinkohlenpetrographie, TEICHMÜLLER, „Die Anwendung des polierten Dünnschliffes bei der Mikroskopie von Kohlen und versteinerten Torfen“. ABRAMSKI und MACKOWSKY berichten über „Methoden und Ergebnisse der angewandten Koksmikroskopie“, STACH über „Mikroskopie natürlicher Kokse“, LICHTENBERG-STRUNK über „Kunstkohle unter dem Mikroskop“, STACH über „Braunkohlenmikroskopie“, RADMACHER über „Die mikroskopische Untersuchungstechnik des Ascheschmelzverhaltens fester Brennstoffe“ und schließlich MACKOWSKY über „Mikroskopische Beobachtungen an Flugstäuben“. Das Ganze, mit vortrefflichen Abbildungen ausgestattet, gibt einen hervorragenden, tief eindringenden Überblick dieses großen und wichtigen Gebietes, das hier zum ersten Male in solcher Vollständigkeit erscheint, so daß dieser Band für lange Zeit maßgebend bleiben wird, sowohl für die technisch-instrumentelle Seite wie für die klar herausgearbeiteten Ergebnisse. Die vorbildlich schöne und sorgfältige Drucklegung macht das Lesen zu einem Genuß.

W.J.Schmidt (Gießen)

Bennett, A. H., Osterberg, H., Jupnik, H., Richards, O. W., Phase Microscopy, Principles and Applications. New York (John Wiley & Sons. Inc.) 1951. IX u. 320 S. mit zahlreichen Abbildungen und einem Frontispiz. Preis gebunden \$ 7,50.

Das von BENNETT, dem Direktor des Forschungslaboratorium der American Optical Company, inaugurierte Buch ist wohl die umfassendste bisher vorliegende Darstellung des Gesamtgebietes; Wesen, Ausführung und Anwendung der Phasenmikroskopie werden hier dargeboten. Die Autoren haben sich so in die Aufgabe geteilt, daß der Physiker OSTERTAG die Theorie in elementarer Art (Kap. 2) und streng mathematisch (Kap. 7) behandelt, die Physikerin JUPNIK das Instrumentarium erörtert (Kap. 3), der Biologe RICHARDS die Anwendungen in Biologie, Medizin und Industrie bearbeitet (Kap. 4, 5, 6). Ein einleitendes Kapitel bringt einiges über das Sehen mit dem Mikroskop, Geschichtliches und die optischen Grundlagen. Es ist unmöglich, in einem Referat üblichen Umfangs den sehr reichen Inhalt des Buches auch nur anzudeuten; es kann hier nur der allgemeine Charakter der Darstellung gekennzeichnet werden: Der Umstand, daß die verschiedenen Teile des Buches jeweils von Fachleuten der betreffenden Sparte behandelt wurden, gereicht der Richtigkeit und Präzision der Darstellung zum großen Vorteil; andererseits freilich setzt sie auch Leser von umfassender naturwissenschaftlicher Bildung voraus. So dürften für den Physiker andere Teile des Werkes die anziehenderen sein als für den Praktiker; für alle aber stellt es eine wichtige Quelle zuverlässiger Belehrung dar, die in der Bibliothek keines Mikroskopikers fehlen sollte, der an der Phasenmikroskopie Anteil nimmt.

W.J.Schmidt (Gießen)

Barer, R., Kontrasteffekt dicker Objekte im Phasenmikroskop (Naturwiss. 39, 427).

Die von FREY-WYSSLING (Naturwiss. 39, 145) mitgeteilten Effekte bei dicken Objekten im Phasenmikroskop hängen gewiß z. T. mit Brechung und Reflexion zusammen und sie sind manchmal so stark, daß normale Phasenkontrastmikroskopie unmöglich wird (so z. B. im hängenden Tropfen). Außer diesen Erscheinungen an geneigten Kanten spielt der Halo eine Rolle; die einfachen Theorien zu seiner Erklärung rechnen mit einem idealen Kontrast, wie er praktisch nicht vorliegt, weil die interferierenden Lichtanteile nicht sauber getrennt sind und auch der beleuchtende durch das Objekt gestört wird. Folgen dieser unvollkommenen Trennung sind die An-

wesenheit des Halo, die Wirksamkeit des unmittelbar an das beobachtete Objektdetail stoßenden Materials (also z. B. bei einem Zellkern des Cytoplasmas) und nicht des Untersuchungsmediums, und der Umstand, daß der Phasenkontrast an Kanten und Phasendiskontinuitäten am besten ausgeprägt ist und in dem Maße abnimmt wie der Phasengradient. So ist in der Mitte eines großen einheitlichen Objektes der Phasenkontrast Null; und die Breite der aktiven Zone bei einem homogenen Objekt hängt von der Breite der Phasenstreifen zur numerischen Apertur des Objektivs ab. Derart versteht sich die breite Außenzone lichtbrechender sphärischer Objekte. Die zentrale Verdunkelung ist schwieriger zu erklären, vielleicht aus dem geringen optischen Gangunterschied zwischen der zentralen Zone und dem Mittel über dem umgebenden Bereich, dessen Ausdehnung von der Breite der Phasenstreifen abhängt. Solche Objekte sollten in Medien von möglichst gleichem Brechungsindex eingeschlossen werden, um Refraktionseffekte zu vermeiden. Wenn doppelbrechende Objekte im Phasenkontrast untersucht werden, sollte man polarisiertes Licht zur Beleuchtung benutzen, da sonst verworrene Bilder entstehen. Liegt z. B. das Medium zwischen den beiden Brechzahlen des Objektes, so entsteht für die eine heller, für die andere dunkler Phasenkontrast; in unpolarisiertem Licht liegen die beiden Bilder übereinander. Wenn man aber einen Polarisator einschaltet, dann zeigt das sphärische Stärkekorn helle und dunkle Quadranten, entsprechend der Wirksamkeit der verschiedenen Brechungsindices in verschiedenen Sektoren. Stärkekörner sind nicht zu dick, um ein gutes Phasenkontrastbild zu geben. Ein geringer Phasenunterschied ist wichtiger als geringe Dicke, und bei Erfüllung dieser Bedingung können auch dickere Objekte, wie lebende Organismen und Gewebe, gute Erfolge liefern. Die Bedeutung des Brechungsindex des Einschlußmittels kann nicht übertrieben werden.

W. J. Schmidt (Gießen)

Barer, R., A vector theory of phase contrast and interference contrast. II. Positive phasecontrast (continued). J. roy. micr. Soc., (III) **72**, 81—91 (1952).

Verf. behandelt an Hand einer Vektorthorie den positiven Phasenkontrast besonders im Hinblick auf die best geeignete Phasenplatte. Obwohl es theoretisch möglich ist, ein gegebenes Objektdetail vollkommen schwarz erscheinen zu lassen, ist doch die Herstellung so spezialisierter Phasenplatten schwierig und auch nicht unbedingt erwünscht. Ein Vergleich der gewöhnlichen 90° ($= \frac{1}{4} \lambda$) Phasenplatte mit einer Auswahl spezialisierter Platten ließ nur geringe Unterschiede erkennen, vor allem bei maximaler oder hoher Absorption der Platte. Bei Platten mit Phasenkontrast von 75° erwies sich der maximale Kontrast als wesentlich unabhängig von der Absorption. Dies ermöglicht eine Methode der Messung des Kontrastes im Objekt.

W. J. Schmidt (Gießen)

Haase, M., Optiker-Taschenbuch. Die kleine Fachlehre des Augenoptikers mit einer Einführung in die Lehre vom Licht, zugleich ein Hilfsbuch für Feinoptiker und verwandte Berufe der optischen Technik. 2. verbesserte Auflage, mit 248 Textabb. Stuttgart (Wissensch. Verlagsgesellschaft m.b.H.) 1952, 320 S. Lwd. DM 14,50.

Das in zweiter Auflage vorliegende Buch ist in erster Linie für den Augenoptiker geschrieben unter Berücksichtigung der Vorschriften der Gesellenprüfung. Es dürfte aber weit über diesen Bereich hinaus bei vielen Beifall finden, die an optischen Instrumenten interessiert sind. Auge und Brille, das Hauptthema des Buches — welches aber auch über Lupe, Mikroskop, Fernrohr, Projektionsapparate, photographische Kammer, Linsenherstellung u. a. berichtet — gehen auch den Mikroskopiker vielfältig an; hier kann er sich über alle einschlägigen Fragen bestens unterrichten. Auch in der Hand des Lehrers, mag er nun Biologe oder Physiker sein, mag das Werkchen Gutes leisten. Am Schluß findet sich eine Zusammenstellung wichtiger optischer

Sachausdrücke auch in englischer und französischer Sprache. Zahlreiche Tabellen vornehmlich aus dem Bereich der Brillenoptik sind angehängt. Der Verlag hat das Werk gut ausgestattet.
W. J. Schmidt (Gießen)

Menzel, E., Dickenmessung mikroskopischer Objekte mit Dreistrahlinterferenzen (Naturwiss. **39**, 398—399, 1952).

Man bildet den Dreifachspalt bei monochromatischer Beleuchtung, verkleinert auf ein homogenes Objektdetail ab und stellt das Mikroskop zuerst scharf darauf ein. Beim Heben des Tubus erscheinen die charakteristischen Interferenzen in bestimmter Höhe z_1 über dem Objekt. Bringt man nun den Mittel- (oder Seiten-)spalt auf das zu messende Detail, so finden sich jetzt die charakteristischen Interferenzen im Abstand z_2 . Aus den abgelesenen Stellungen des Tubus für z_1 und z_2 , der bekannten Brechzahl des Objektdetails und seiner Umgebung, läßt sich nach bestimmten Formeln die Objektdicke errechnen. Im Auflichtmikroskop können so sehr genau Stufen gemessen werden.
W. J. Schmidt (Gießen)

Verner, R., Über einige neue Arbeitsmethoden und Geräte in der metallographischen und mineralogischen Schleif- und Poliertechnik. Mit 13 Abb. (Mikroskopie **7**, 154—164, 1952).

Verf. berichtet zunächst über die Schleifmaschine von JARRETT, bei der 6 bis 12 Proben mittels Einbettmasse in eine Scheibe eingegossen, zusammen geschliffen und poliert werden; jedoch soll es nicht möglich sein, kratzerfreie Schläffe zu erhalten. Einen wesentlichen Fortschritt bedeutet das elektrolytische Polierverfahren, bei dem der Schliff als Anode in ein entsprechendes Bad gehängt wird. Bei richtiger Stromdichte werden die durch Kratzer verursachten Schliffunebenheiten bis zu einer spiegelblanken Fläche abgetragen. Die Verhältnisse am Elektropoliergerät von WATSMAN-BUEHLER werden näher behandelt und die Ergebnisse an Mikrophotogrammen vorgeführt. Ein Verfahren zur Erhaltung nichtmetallischer Einschlüsse im Metallschliff verwendet nach BUEHLER feingeschlammten Diamantstaub, wobei an Stelle von Wasser, um der Korrosion entgegenzuwirken, Kohlenstofftetrachlorid verwendet wird (als „Diamet-Hyprez“ in handlicher Packung mit Zerstäuber erhältlich). WYMAX bettet die Schliffproben in Bakelit-Pulver ein, das durch Pressen und elektrisches Erhitzen verflüssigt wird. Dafür sind besondere Einbett-Schliffpressen hergestellt. Schließlich behandelt Verf. moderne Trennschleifmaschinen (zum Abschneiden der Proben) mit rotierender Korundschleif- oder diamantbesetzter Stahlscheibe. Die weit zerstreute Literatur ist angegeben.
W. J. Schmidt (Gießen)

Reichert, K., Eine Zusatzoptik zur Ausleuchtung großer Dingfelder bei Verwendung schwächster mikroskopischer Vergrößerungen. Mit 3 Abb. (Mikroskopie **7**, 84—88 1952.)

Durch Zufügen einer (ausklappbaren) Linse unter dem Kondensor wird gleichmäßige Erhellung des großen Feldes schwacher Objektive erreicht: ähnlich wie bei Diapositivprojektion durchsetzen die von den einzelnen Punkten der Lichtquelle ausgehenden Strahlen das Präparat als konvergierende Büschel.

W. J. Schmidt (Gießen)

Debrunner, H. U., Probleme der Lupenphotographie. 5 Abb., 1 Tabelle (Mikroskopie **7**, 97—106, 1952).

„Lupenphotographie“ (zwischen Bildmaßstab 1:1 und etwa 30:1) kann mittels Kamera unter Zuhilfenahme von Vorsatzstutzen oder -linsen erfolgen oder auch mit mikrophotographischen Objektiven. Abbildungsmaßstab, Format der Vorlage, Tiefenschärfe, Belichtungsfaktor, Abstand des Objekts von der Kamera werden eingehend behandelt und abschließend praktische Winke gegeben.

W. J. Schmidt (Gießen)

Schwöbel, W., Beschreibung einer einfachen Zeitraffereinrichtung für Mikrozeitrafferfilme. Mit 3 Abb. (Mikroskopie 7, 115—120, 1952).

Verf. schildert eine einfache und zweckmäßige Zeitrafferapparatur, die mit einer beliebigen Filmkamera benutzt und von einem geschickten Institutsmechaniker hergestellt werden kann. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Haberlandt, H., Neue fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen bei Mineralien. Mit einer Farbtafel u. 7 Abb. (Mikroskopie 7, 75—84, 1952).

Verf. führt an guten Mikrophotogrammen die Fluoreszenzerscheinungen an verschiedenen Mineralien vor, teils an Schliffrücken, teils an Spaltblättchen. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Gurr, G. T., Biological Staining Methods, 5th Edit. London 1952 (George T. Gurr Ltd.). VII u. 87 S. mit vier farbigen Bildern. sh 5,6.

Das von der Firma George T. Gurr Ltd. London, einem Lieferanten von Farbstoffen, Immersionsölen, Einbettungsmedien und anderem Bedarf des Mikroskopikers, herausgegebene Büchlein, seit 21 Jahren erscheinend, gibt in der neuen Auflage eine Zusammenstellung von Färbungsrezepten vor allem im Bereich des medizinischen Laboratoriums. Es wendet sich in erster Linie an die technischen Hilfskräfte. Doch enthält es, insbesondere für den deutschen Leser, mancherlei, das für jeden Mikroskopiker vom Interesse ist, wie Angaben über Einbettungsmittel "Aquax", Schmelzpunkt 54° C, in Wasser aber auch Alkohol und Xylol löslich; die Objekte kommen fixiert oder unfixiert in das erwärmte Medium; Esterwachs von besonders guter Schneidbarkeit. Einschlußmittel Clearax mit hoher Brechzahl 1,6020 (für Diatomeen); M. A. C. Mountant and Cove, das zum Überziehen von Ausstrichen mit einem nichtbrüchigen klaren Film dient, der ein Deckglas überflüssig macht; er kann mit Azeton entfernt werden. Nützliche Tabellen z. B. über Löslichkeit von Farben in Wasser und Alkohol sind angehängt. *W. J. Schmidt* (Gießen)

Neumann, K., Grundriß der Gefriertrocknung. Göttingen („Musterschmidt“) 1952. 133 S. mit 88 Abb. DM 9,80.

Gefriertrocknung wird heute in zahlreichen Fällen angewandt. Das vorliegende Buch behandelt vor allem ihre Bedeutung für den Biologen und berichtet ausführlich über den Gebrauch dieses Verfahrens in der Histologie, in der es für gewisse histochemische, -physiologische und radioautographische Untersuchungen unentbehrlich geworden ist. Nach Darlegung der physikalischen und technischen Grundlagen werden die bisherigen Einrichtungen für Laboratoriumsarbeiten geschildert. Verf. hat hauptsächlich mit der Gefriertrocknungsanlage G 1 b von LEYBOLD, Köln-Bayenthal, gearbeitet, die für histologische Arbeiten bestimmt, ein kompensierte schrankartiges Gerät darstellt, das bequem auf einem Tisch aufgestellt werden kann und durch große Betriebssicherheit ausgezeichnet ist. An der rechten Seitenwand des Schrankes finden sich die zwei Trockenräume, Gläser von 40 mm Durchmesser und 250 mm Länge, die mittels Schliff an das Pumpsystem zur Evakuierung angeschlossen sind. Zur Kühlung wird über die Trockenräume je ein Dewargefäß geschoben, welches mit einem Alkohol-Kohlensäuregemisch geeigneter Temperatur gefüllt ist. Die im Innern des Schrankes befindliche Vakuumeinrichtung besteht aus einer Vorpumpe in Verbindung mit einer Öldiffusionspumpe. Bedienung und Wartung des Apparates werden genau erläutert. Meist reicht eine Trockentemperatur von —40° C aus; ein bis zwei % Wasser bleiben dabei im Objekt zurück; dieses Restwasser kann aber durch eine weitere Trocknung bei Zimmertemperatur auf 0,5 bis 0,1 % herabgedrückt werden. Die Paraffineinbettung erfolgt im Vakuum. Die ganze Apparatur ist hoch entwickelt; hinsichtlich zahlreicher interessanter Einzelheiten muß auf die Darstellung selbst verwiesen werden. Ein ausführliches Literaturverzeichnis beschließt das Buch, durch dessen Abfassung

erf. sich ein großes Verdienst erworben hat; denn das Gefriertrocknungsverfahren wird in Deutschland im histologischen Laboratorium noch wenig gehandhabt. Die Ausstattung ist gut und der Preis angemessen.
W. J. Schmidt (Gießen)

Mauser, J., Ausschaltung des Xylols in der histologischen Technik (Mikroskopie 7, 208—210, 1952).

Das fixierte Material kommt aus Wasser je 15—30 Minuten in 60%igen und schließlich dreimal gewechselten absoluten Isopropylalkohol, wobei der letzte auf 50° C erwärmt wird, dann direkt in Paraffin oder in eine Mischung gleicher Teile von Paraffin und Alkohol und zuletzt in reines Paraffin (bis 24 Stunden). Entparaffinierung mit absolutem Isopropylalkohol von 50° C, dann 90%iger Alkohol, destilliertes Wasser. Nach der Färbung wird über zweimal gewechselten absoluten Isopropylalkohol in Sandabalsam eingeschlossen.
W. J. Schmidt (Gießen)

Frank, H., Tafeln zur klinisch-mikroskopischen Diagnostik. Berlin 1952 (Walter de Gruyter & Co.). IV und 84 S. GzL DM 10,—.

Das Büchlein ist eine Zusammenstellung der Tafeln aus des gleichen Verfs. Monographie „Klinische Laboratoriumsmethoden“ (das in dieser Zeitschrift besprochen wurde, s. Bd. 61 S. 149). Es soll die tägliche Arbeit am Mikroskoptisch erleichtern durch eine rasche Information an Hand der zahlreichen, zum Teil farbigen guten Bilder. In der Hand des Erfahrenen dürfte es eine nützliche Hilfe bedeuten.

W. J. Schmidt (Gießen)

Hepner, W., Über die Verwertung menschlicher Exkremente in der kriminalistischen Spurenkunde. Mit 28 Abb. (Mikroskopie 7, 107—115, 1952).

Eine gut illustrierte und aufschlußreiche Darstellung, wie der Kriminalist aus der mikroskopischen Untersuchung von menschlichen Ausscheidungen wertvolle Hinweise auf zuvor unbekannte Täter und dergl. erhalten kann.

W. J. Schmidt (Gießen)

Reichenow, E., Lehrbuch der Protozoenkunde. Eine Darstellung der Naturgeschichte der Protozoen mit besonderer Berücksichtigung der parasitischen und pathogenen Formen. 6. Auflage zweiter Teil, Spezielle Naturgeschichte der Protozoen. 1. Hälfte: Mastigophoren und Rhizopoden. Mit 393 Abb. im Text, IV und Seiten 411—776. Jena (G. Fischer) 1952. Brosch. DM 20,—.

Von dem speziellen Teil der sechsten Auflage liegt nun die erste Hälfte, die Mastigophoren und Rhizopoden umfassend, vor, bereichert um die vielfachen großen und kleinen Fortschritte seit 1929, was sich sowohl im Text wie in neuen Abbildungen und in den Literaturzusammenstellungen ausspricht. Hoffentlich folgt auch der übrige Teil des Werkes bald nach, damit das vortreffliche und unentbehrliche Buch, das für Biologie und Medizin von hoher Bedeutung ist, bald wieder vollständig zur Verfügung steht.

W. J. Schmidt (Gießen)

Pfeiffer, H. H., Beitrag zur Morphologie der periodischen Segmentierung quergestreifter Muskeln (Mikroskopie 7, 266—270, 1952).

Die im Vergleich zu den Q-Gliedern schwächere positive Doppelbrechung der I-Glieder der quergestreiften Myofibrillen ist in neuerer Zeit auf negativ doppelbrechende und also kompensierende Einlagerungen zurückgeführt worden, auf Lipide, Nucleotide oder eine sogenannte N-Substanz. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden, hat Verf. an Muskelfasern von Drosophilalarven Verdauungsversuche mit Nuclease aus Reiskleie angestellt (Verfahren nach CONTARDI und RAVAZZONI,

Abänderung nach SERRA und QUEIROZ LOPEZ) mit dem Erfolg, daß nach genügender langer Einwirkung die vorher quasi isotropen Glieder auch positiv doppelbrechend wurden, was auf Entfernung von Nucleinsäure hinweist. Die Änderung der Doppelbrechung längs der Faser wird an unbehandeltem und mit Nuclease bearbeitetem Material in Kurven vorgeführt, die durch Vorbeiführen des Objektes am Spalt eines Ocularphotoelementes gewonnen wurden.

W. J. Schmidt (Gießen)

Joe Hin Tjio u. Levan, Alb, The use of oxyquinoline in chromosome analysis with an appendix: STALFELT, M. G., The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity (Anales estacion exper. de Aula Dei vol. 2, 1950, S. 21—64).

Oxychinolin (vorzugsweise als 0,002 mol/l Lösung) lassen JOE HIN TJIO und LEVAN im allgemeinen 4 Stunden auf Wurzelspitzen wirken; am besten bewährte sich eine Temperatur von 18°. Hiernach im Uhrglas Behandlung mit 2% Orcein in 45% Essigsäure 9 Teile, nHCl 1 Teil; mäßige Erhitzung 3- oder 4mal je 5—10 Sekunden. Bei schlecht macerierbaren Objekten (Gramineen) füge man nach der ersten Erhitzung noch 1—2 Tropfen n-HCl zu den Objekten. Schließlich Übertragen der Wurzelspitzen in einen Tropfen 2% Orcein in 45% Essigsäure auf den Objektträger und Pressung des Gewebes.

Küster (Gießen)

Auf diese Methoden kann man also in der Elektronenmikroskopie nur bedingt zurückgreifen. So haben wir die Bindegewebsversilberung nach GOMORI (1937) zur Differenzierung der Bindegewebsfibrillen in der Elektronenmikroskopie herangezogen (v. HERRATH und DETTMER, 1951; DETTMER, NECKEL und RUSKA, 1951; DETTMER, 1952; SCHWARZ, 1952; SCHWARZ und DETTMER, 1952). Wir sind uns darüber im klaren, daß dies eine rein empirische Differenzierung ist und solange bleiben muß, bis der Mechanismus der Bindegewebsversilberung geklärt ist (vgl. dazu LIPP, 1951 und 1952).

Für unsere Bindegewebsuntersuchungen suchten wir vor allem nach einer Methode zum Nachweis der Polysaccharide. Nun gibt es in der Histologie eine Reihe von Polysaccharidmethoden, auf die näher einzugehen hier zu weit führen würde. Die Bedingung der Spezifität wird am ehesten von der von McMANUS (1946) und HOTCHKISS (1948) angegebenen Methode erfüllt, die zwei genaue bekannte Reaktionen anwendet. Durch die erste Reaktion, die Einwirkung von Perjodsäure, werden im Gewebe Aldehyde erzeugt, die dann mit fuchsinschwefliger Säure nachgewiesen werden. Die Perjodsäurereaktion ist in ihren Einzelheiten vielfach untersucht worden. Sie oxydiert die 1,2-Glycolbindung (CHOH-CHOH) zu zwei Aldehydgruppen, wobei die Bindung zwischen den C-Atomen aufgeschlagen wird. Wenn eine der beiden Gruppen bereits in Ketoform vorliegt, wird die andere dennoch zum Aldehyd oxydiert. Diese Oxydation tritt auch ein, wenn sich an einer der beiden Gruppen eine Amino- oder Alkylaminogruppe befindet, sie tritt dagegen nicht ein, wenn die Hydroxylgruppen irgendwie anderweitig substituiert worden sind. Eine Oxydation über die Aldehydstufe hinaus erfolgt nicht. Diese Reaktion der Perjodsäure ist bei einem p_H unter 6 hochgradig spezifisch (CLARA, 1952; HOTCHKISS, 1948; NICOLET und SHINN, 1939). Damit wäre die erste Bedingung, die wir an die Elektronenfärbung zu stellen hätten, erfüllt. Es fragt sich nun, wie wir den anderen Bedingungen gerecht werden können. Die fuchsinschweflige Säure als Nachweisreagens für die freigesetzten Aldehyde ist für uns nicht anwendbar, weil sie nicht den genügenden Kontrast im Elektronenbild ergibt. Wir müssen als zweite Reaktion eine Schwermetallreaktion verwenden. Es lag nahe, sich einer Silberlösung zu bedienen, denn bekanntlich wird eine ammoniakalische Silberlösung durch Aldehyde reduziert. Auch ist Silber bereits von MITCHELL und WISLOCKI (1944), von PRITCHARD (1949) und von GOMORI (1946) zum Nachweis von Mucin und Polysacchariden verwendet worden, nur nicht in Verbindung mit Perjodsäure. Das von den im Gewebe erzeugten Aldehydgruppen reduzierte Silber müßte bei geeigneter Methodik im Elektronenmikroskop nachweisbar sein.

Technik

Um den histochemischen Charakter der Methode zu wahren, mußten wir auf alle Hilfsmittel der klassischen Silbermethoden verzichten. Hierzu gehören im wesentlichen die Entwicklung und die Tonung. Die Entwicklung beruht auf einer Reduktion noch vorhandenen reaktionsfähigen Silbers im Gewebe durch Zusatz eines geeigneten Reduktionsmittels. Dabei setzt sich das Silber zwar bevorzugt an Stellen ab, an denen bereits reduziertes Silber liegt, andererseits ist aber von LIESEGANG (1910) nachgewiesen worden, daß die Silberlösung und auch in gewissem Maße bereits reduziertes Silber dem zugesetzten Reduktionsmittel entgegenwandern (vgl. hierzu LÖWENSTÄDT (1924). Dadurch könnte eine nicht unwesentliche Verschiebung der im Gewebe reduzierten Silberteile zustandekommen, die im Elektronenbild zu Fehlschlüssen führen könnte. Die Tonung mit Goldchlorid dürfte zwar kaum eine Änderung der Topographie des abgelagerten Silbers herbeiführen, sie ist aber nicht ohne Einfluß auf die Quantität des Niederschlages. So kann eine schwache Reaktion durch Tonen

wieder aufgehoben werden, während ein relativ starker Niederschlag durch Tonung noch verstärkt wird. Man kann also schwache Unterschiede in der Reaktion mit Goldchlorid „differenzieren“, das heißt die Unterschiede verstärken. Das Resultat entspricht natürlich dem Silberbild nicht in allen Punkten. Wir mußten daher die Tonung nach Möglichkeit vermeiden.

Nach allem Gesagten gibt es nur eine methodische Möglichkeit, die sich in ihrem Reaktionsablauf übersehen läßt:

1. Behandlung mit Perjodsäure,
2. Behandlung mit einer leicht reduzierbaren Silberlösung,
3. Fixierung, also Entfernung des nicht reduzierten Silbers aus dem Präparat.

Zwischen diesen Arbeitsgängen muß gründlich ausgewaschen werden. Der methodische Ablauf ist also denkbar einfach. Theoretisch muß man die Schwärzung der Perjodsäure-aktiven Substanz dann wohl so erklären, daß zunächst durch die Aldehydgruppen Silber reduziert wird und dadurch „Keime“ gebildet werden, die dann autokatalytisch wachsen. Eine Wanderung der „Keime“ ist nicht anzunehmen, da ja das Milieu nicht verändert wird.

Durch das autokatalytische Wachstum der Silberkeime wird das „Silberkorn“ so weit vergrößert, daß es im Elektronenmikroskop zu sehen ist. Man muß sich dabei im klaren sein, daß dies Vorgehen der Forderung nach quantitativer Reaktion nicht gerecht wird. Am günstigsten wäre es ohne Zweifel, wenn man das Schwermetall selbst oder einen mit Schwermetall „beladenen“ Stoff direkt und quantitativ an nachzuweisende Substrat koppeln könnte. Entsprechende Versuche sind bei uns im Gange. Aber es ist die Frage, ob die dadurch erzielte Erhöhung der Dichte ausreicht, um eine deutliche Kontrasterhöhung im Elektronenmikroskop herbeizuführen. Diese Schwierigkeit entfällt bei der Silbermethode.

Zunächst prüften wir an geeigneten Präparaten im histologischen Schnitt die Übereinstimmung dieser Reaktion mit der Perjodsäure-Schiff-Technik. Die Ergebnisse stimmten fast überein, sie unterschieden sich nur in einem Punkte. Die Gruppen nämlich, die auch ohne Vorbehandlung mit Perjodsäure reduzierend wirken, werden bei der Silbermethode stärker erfaßt. Alle „argentaaffinen“ Stoffe, wie zum Beispiel Pigmente, werden also mit „angefärbt“, ähnlich wie bei der Färbemethode für Mucin nach GOMORI. Hierdurch wird eine Kontrolle der Perjodsäurewirkung notwendig, die man leicht gewinnt, indem man die Perjodsäure bei einem Teil des Materials nicht einwirken läßt, sondern diesen Teil sofort in die Silberlösung bringt. Störende reduzierende Gruppen können bis zu einem gewissen Grade durch Vorbehandlung der Objekte mit Bisulfit beseitigt werden. Die Perjodsäurereaktion wird dadurch nicht behindert.

Nach einigen Proben mit verschiedenen Silberlösungen verwendeten wir nur noch die von GOMORI angegebene Lösung mit Hexamethylentetramin, weil sie die klarsten Resultate ergab.

Nachdem am histologischen Schnitt die Brauchbarkeit der Methode überprüft war, kam es darauf an, sie an Präparaten zu verwenden, die für eine Untersuchung im Elektronenmikroskop vorgesehen waren. Da wir im wesentlichen mit der Schnitt-Schall-Präparation nach WOLPERS arbeiten (Gefrierschnitte, die anschließend durch hochfrequenten Schall noch weiter zerkleinert werden), mußte die Methode so modifiziert werden, daß sie auch für beschalltes Material brauchbar war. Wir wenden zu diesem Zweck dieselbe Technik an, die wir schon für die Bindegewebsversilberung nach GOMORI für beschalltes Material benutzten. Die einzelnen Arbeitsgänge werden in der Zentrifuge durchgeführt. Die über dem abzentrifugierten Material stehende Flüssigkeit wird jeweils mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pipette

bis fast zur Trockene abgesogen. Bei sauberem Arbeiten lassen sich elektronenmikroskopische Präparate erzielen, die frei von Niederschlägen sind. Mehrmaliges, gründliches Waschen zwischen den einzelnen Arbeitsgängen ist Voraussetzung dafür.

Im Einzelnen hat sich folgendes Vorgehen als zweckmäßig erwiesen:

1. Behandeln des gründlich gewässerten, fixierten oder unfixierten Materials mit einer 2%igen Natriumbisulfatlösung 15 Min.
2. Mehrmaliges Waschen in dest. Wasser.
3. 15 Min. Perjodsäurelösung (auf 100 ccm 1%iger Perjodsäure 10 ccm m/5 Natriumacetatlösung).
4. Sorgfältiges Waschen (wenn nicht alle Perjodsäure entfernt ist, gibt es in der Silberlösung einen Jodniederschlag).
5. Silberlösung nach GOMORI folgender Zusammensetzung: Lösung A: zu 100 ccm einer 3%igen Hexamethylentetraminlösung werden 5 ccm einer 5%igen Silbernitratlösung hinzugefügt. Der auftretende Niederschlag löst sich sofort wieder auf. Die Lösung ist im Eisschrank haltbar. Lösung B: Zu 100 ccm einer 1,9%igen Boraxlösung kommen 10 ccm 1,44%ige Borsäure. Die Lösung ist haltbar. Gebrauchsfertige Lösung: Stammlösung A 25 ccm, dest. Wasser 25 ccm, Stammlösung B 5 ccm.

Die Einwirkung der Silberlösung geschieht bei 37° und dauert etwa 8 bis 12 Stunden.

6. Gründliches Waschen in doppelt dest. Wasser.
7. Fixieren in einer 1%igen Natriumthiosulfatlösung 1 Min.
8. Waschen.

Im Anschluß daran kann das Material nochmals kurz durch hochfrequenten Schall aufgelockert werden. Dann kann es auf befilmte Objektblenden aufgetrocknet und mikroskopiert werden. Zu beachten ist, daß man das Material etwas stärker färbt, als es für die Betrachtung im Lichtmikroskop nötig wäre. Lösliche Aldehyde ergeben natürlich einen diffusen Niederschlag, sie müssen vorher gründlich ausgewaschen werden. Wenn man einen reinen Effekt der Perjodsäure beurteilen will, muß man dann natürlich darauf achten, daß die Kontrolle farblos bleibt. Eine zweite Kontrollmöglichkeit ist von MC MANUS und CASON (1950) angegeben worden. Sie acetylieren die 1,2-Glycolbindung, indem sie eine Mischung von Essigsäureanhydrid (13 ccm) und Pyridin (20 ccm) 45 min auf das Objekt einwirken lassen. Die so vorbehandelten Präparate dürfen keine Reaktion mehr ergeben. Die Reaktion tritt aber wieder auf, wenn man mit schwachem Alkali (0,1 n KOH) 45 min bei Zimmertemperatur eine Deacetylierung der 1,2-Glycolbindung herbeiführt.

Eine Fixierung der Objekte wird sich danach richten, welche Stoffklassen nachgewiesen werden sollen. Will man Monosaccharide oder niedere polymere wasserlösliche Polysaccharide nachweisen, dann wird man wäßrige Fixierungsmittel vermeiden. Bei nicht wasserlöslichen hochpolymeren Polysacchariden fixiert man am besten in neutralisiertem Formalin, das vor der „Färbung“ gründlich ausgewaschen werden muß. Unfixierte Objekte quellen leicht. Schwermetallhaltige Fixierungsmittel wie Osmiumsäure sind aus den oben angegebenen Gründen nicht anwendbar.

Diskussion

Eine Übersicht über die Stoffe, die im Gewebe eine Reaktion ergeben können, da sie die 1,2-Glycolbindung enthalten, ist von LEBLOND (1950), CLARA (1952) u. a. gegeben worden. Man kann sie in drei Gruppen unterteilen:

- a) wasserlösliche Substanzen: Monosaccharide, einige Aminosäuren und Proteine;

- b) fettlösliche Substanzen: Glycolipide (Steroide und Cerebroside);
- c) wasser- und fettunlösliche Substanzen: Hierher gehören die hochpolymeren Polysaccharide, Kohlenhydrat-Proteinkomplexe, sowie einige Proteine.

Proteine kommen für die Perjodsäure-Reaktion kaum in Frage, weil die Glycolgruppen ihrer Aminosäuren so gebunden sind, daß sie nicht reagieren können, vielleicht mit Ausnahme des Hydroxylysins (HOTCHKISS). Auch Nucleoproteide ergeben keine Reaktion, weil HJO_4 im Gegensatz zur Säurehydrolyse hier keine Aldehydgruppen frei macht. Es bleiben also praktisch nur die Polysaccharide und die Polysaccharid-Proteinkomplexe als reaktionsfähige Substanzen der unter c) genannten Gruppe übrig.

Durch geeignete Vorbehandlung und die Anwendung von Fermenten ist eine Trennung der oben angegebenen Stoffklassen im Präparat möglich. Die wasserlöslichen Substanzen gehen bei der Behandlung mit Wasser oder wasserhaltigen Fixierungsmitteln in Lösung. Die fettlöslichen Substanzen können nach LEBLOND durch Extraktion in einer Lösung von gleichen Teilen Chloroform und Methanol entfernt werden.

Nachdem man diese Stoffklassen ausgeschieden hat, bleiben nur die Kohlenhydrate und deren Proteinkomplexe. Um hier noch eine Trennung der reagierenden Substanzen herbeizuführen, kann man zunächst durch Anwendung von Amylase das Glycogen entfernen. Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure können durch Anwendung geeigneter Hyaluronidasen u. U. getrennt werden.

Die Stärke der Reaktion ist einmal von der Menge der die Glycolgruppen tragenden Substanz abhängig, andererseits von der Anzahl der jeweils reaktionsfähigen Gruppen im Molekül dieser Substanz. Die Mucopolysaccharide werden infolge ihres höheren Gehaltes an Polysaccharid eine stärkere Reaktion ergeben als die Mucoproteine, vorausgesetzt, daß sie in gleicher Konzentration vorhanden sind. Man hat also mit Hilfe der Perjodsäuretechnik die Möglichkeit, recht spezifische Aussagen über das Vorkommen bestimmter Substanzen zu machen. So hat auch diese Methode zu einer Reihe neuer Befunde in der Histologie geführt, erwähnt seien hier nur die Arbeiten von HOTCHKISS, LILLIE (1947), LEBLOND, DAY (1950), CLARA und die von GRAUMANN (1951). Die fortschreitende Untersuchung von Gewebsstrukturen in der Elektronenmikroskopie erfordert immer mehr und mehr die Beziehung zu den histologischen und besonders zu den histochemischen Befunden. Diese Beziehung läßt sich durch die modifizierte Perjodsäuretechnik herstellen. Dadurch ist nicht nur die Möglichkeit gegeben, die histologischen Befunde zu vertiefen, sondern auch gewisse Stoffe, vor allem die Polysaccharide, im submikroskopischen Bereich zu erfassen. Kleinste Stoffmengen, die auch mit den besten mikrochemischen Methoden nicht mehr nachzuweisen sind, können auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Bei beschalltem Material kommt man mit ganz geringen Mengen aus.

Über die Anwendung der Methode bei der Darstellung von Polysacchariden in verschiedenen Geweben wird an anderer Stelle zu berichten sein. Hier sei nur ein Beispiel demonstriert, ohne auf die Befunde im einzelnen einzugehen. Es handelt sich um menschliche Cornea. Nach Einwirkung der Perjodsäure findet man an der Oberfläche der Fibrillen und in der Kittsubstanz zahlreiche kleine Silberkörnchen, die die Lage des Polysaccharids (in diesem Falle Hyaluronschwefelsäure) anzeigen. Die schon von MEYER (1948) ausgesprochene Vermutung, daß die Polysaccharide in der Kittsubstanz der Cornea lokalisiert seien, findet damit ihre Bestätigung. SCHWARZ (1952) erhob den gleichen Befund mit Hilfe von Fermentmethoden. Inzwischen hat H. PAHLKE die angegebene Methode an Sehnenkollagen durchgeführt. Dabei ergibt sich eine „Anfärbung“ der D-Teile reifer Kollagenfibrillen (Z. Zellforsch. 39, 421, 1954).

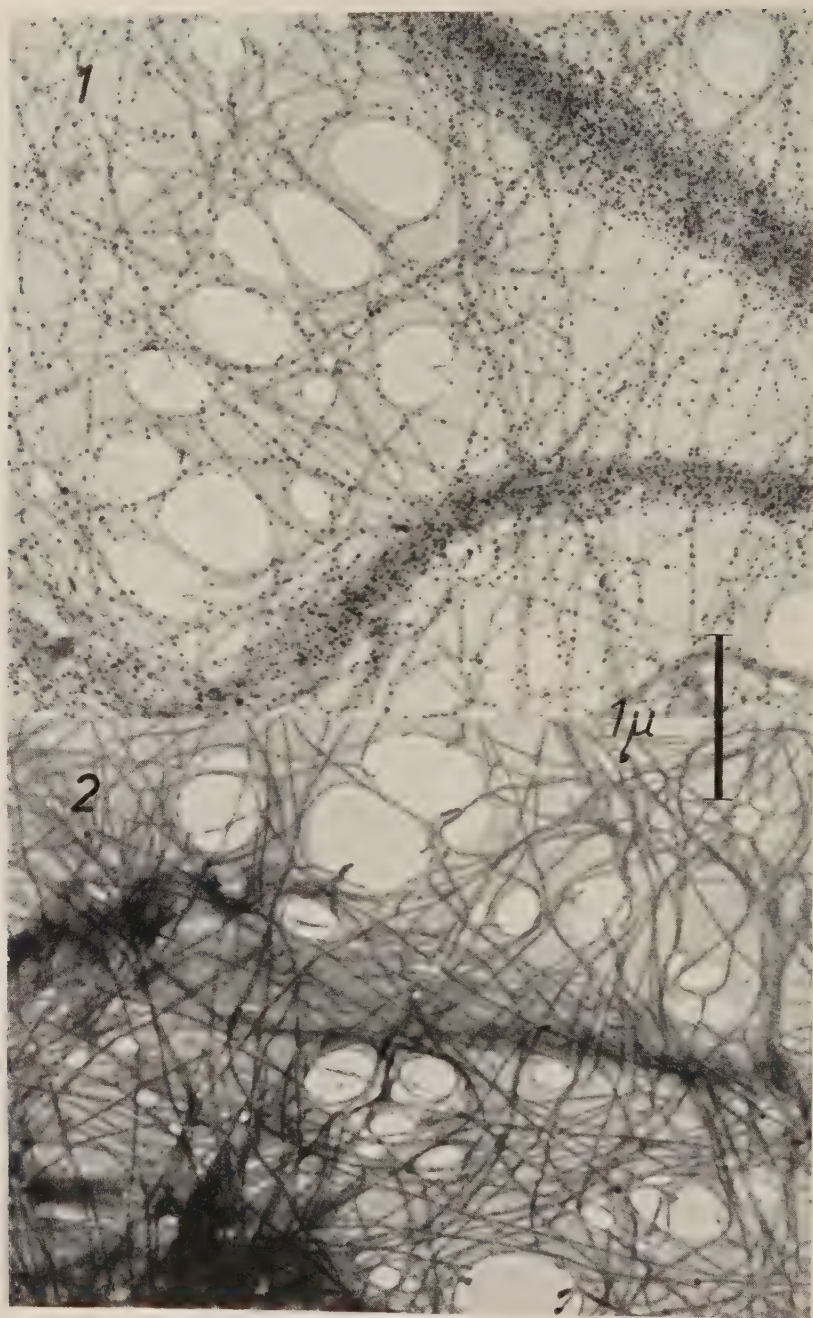


Abb. 1. Cornea vom Menschen, fixiert in Formol, Schnitt-Schallpräparation, Behandlung mit Perjodsäure und anschließend Silberlösung. Silberkörner an den Stellen, an denen 1,2-Glycolbindungen aufgeschlagen worden sind
Vergr. 21 500 : 1

Abb. 2. Das gleiche Präparat wie in Abb. 1, nur zur Kontrolle ohne Vorbehandlung mit Perjodsäure. Gleiche Einwirkungszeit der Silberlösung
Vergr. 21 500 : 1

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, mit der elektronenmikroskopisch Stoffe erfaßt werden können, die die 1,2-Glycolbindung enthalten, wie zum Beispiel Polysaccharide. Die Methode besteht aus zwei Reaktionen; zuerst wird die 1,2-Glycolbindung durch Perjodsäure aufgeschlagen, wobei Aldehydgruppen entstehen, dann werden diese Aldehydgruppen durch Reaktion mit Silber nachgewiesen. Eine „Entwicklung“ des Silbers durch nachträglichen Zusatz eines Reduktionsmittels erfolgt nicht.

Am Beispiel der Cornea wird das Ergebnis der Methode demonstriert.

Schrifttum

CLARA, M., Z. Zellforsch. **37**, 389, 1952. — DAY, R., Amer. J. Ophthalm. **33**, 1950. — DETTMER, N., Z. Zellforsch. **37**, 89, 1952. — DETTMER, N., I. NECKEL und H. RUSKA. Z. wiss. Mikrosk. **60**, 10, 1951. — GOMORI, G., Am. J. Path. **13**, 993, 1937; Amer. Jour. Clin. Path., Tech. Sect. **10**, 7, 1946. — GRAUMANN, W., Anat. Anz. **99**, 19, 1951. — GROSS, J., J. Gerontol **5**, 1950. — HERRATH, E. von und N. DETTMER, Z. wiss. Mikrosk. **60**, 282, 1951. — HOTCHKISS, R. D., Arch. Biochem. **16**, 131, 1948. — LEBLOND, C. P., Amer. J. Anat. **86**, 1, 1950. — LILLIE, R. D., J. Lab. Clin. Med. **32**, 910, 1947. — LIPP, W., Z. wiss. Mikrosk. **61**, 38, 1952; Protoplasma **40**, 275, 1951. — LIESEGANG, Journ. f. Psychol. u. Neurol. **17**, 1910. — LISON, L., Arch. de Biol. **46**, 599, 1935. — LÖWENSTÄDT, H., Z. exper. Med. **39**, 355, 1924. — McMANUS, J. F. A., Nature **158**, 202, 1946. — McMANUS, J. F. A., und J. E. CASON, J. exper. Med. **91**, 651 (1950). — MITCHELL, J., und G. B. WISLOCKI, Anat. Rec. **90**, 261, 1944. — NICOLET, B. H., und L. A. SHINN, J. mer. Chem. Soc. **61**, 1615, 1939. — PRITCHARD, J. J., J. Anat. **83**, 30, 1949. — SCHWARZ, W., Z. Zellforsch. **38**, 26, 1953. — SCHWARZ, W. und N. DETTMER, Virchows Arch. **323**, 243, 1953. — VOLPERS, C., Klin. Wschr. **22**, 624, 1943.

[Eingegangen am 23. Dezember 1952]

aus der Anatomischen Anstalt der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. E. von HERRATH) und aus der Forschungsabteilung der Freien Universität Berlin am Institut für Mikromorphologie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Substantia propria des normalen menschlichen Trommelfells

Von Renate Marotzke

(Mit 5 Abbildungen)

Einleitung

Die Funktion des Trommelfells ist weitgehend abhängig von der Beschaffenheit des „Trommelfellskelettes“, nämlich der Substantia propria. Der Verlauf der Bindegewebsfasern innerhalb der Substantia propria wurde von KOLMER im Handbuch der mikroskopischen Anatomie 1927, Bd. 111, 1 eingehend beschrieben. Außer kollagenen und elastische Fasern in der Substantia propria nachgewiesen worden (VARAGLIA

1899, WATSUJI 1903), deren Vorkommen jedoch von FILAGAMO (1949) bestritten wird. Die mechanischen Eigenschaften des Trommelfells (kleines Dekrement) werden im allgemeinen in der Literatur von der Anordnung des Fasersystems abhängig gemacht (SECONDI, 1951).

Nach der Herausnahme behält das Trommelfell seine eigenartige trichterförmige Form. Bei der geringen Dicke ist dieses Verhalten besonders auffällig und läßt sich nur auf die besondere Konsistenz zurückführen. Außerdem weist das Trommelfell eine gewisse Transparenz auf, die mitunter die Gehörknöchelchen durchschimmern läßt. Diese Eigenschaften der Substantia propria — die bedeckenden Membranen sind hierbei von untergeordneter Bedeutung — bedingen eine gewisse Sonderstellung innerhalb des Bindegewebes. Bekanntlich erscheint eine Sehne weiß und völlig undurchsichtig. Ein gutes Beispiel ist hierfür die Sklera, die auch in dünnen Lagen undurchsichtig ist. Sie besteht aus einer ähnlichen Grundsubstanz wie sie auch im Trommelfell vorkommt, lediglich die Anordnung und Dicke der Fasern der Grundsubstanz ist eine andere. Dabei möchte ich nach SCHAFER die Grundsubstanz als die Summe von Fasern und Kittsubstanz definieren. Man muß also den Unterschied in der Transparenz von Trommelfell und Sehne in der Beschaffenheit der Grundsubstanz suchen. Zum Vergleich wäre auch die Grundsubstanz anderer transparenten und durchsichtiger Bindegewebsarten heranzuziehen. Sowohl über die Grundsubstanz der Sklera als auch über die der Cornea liegen elektronenmikroskopische Untersuchungen vor (SCHWARZ, 1952). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, daß die Differenzierung der Grundsubstanz der Trommelfellpropria lichtoptisch nur zu einem geringen Teil möglich sein wird. Nach diesen Untersuchungen ist die Transparenz eines Gewebes im wesentlichen von der Relation zwischen Fibrillen und Kittsubstanz abhängig. Auch für die Konsistenz eines Gewebes spielt diese Relation danach offenbar eine Rolle. Die Dicke der Fibrillen und die Beschaffenheit der Kittsubstanz müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Diese Faktoren dürften auch für die Transparenz und Konsistenz der Substantia propria des Trommelfells von Bedeutung sein. Aus diesem Grunde wurde sie elektronenmikroskopisch untersucht. Mit Hilfe bestimmter histologischer Färbemethoden soll darüber hinaus versucht werden, die Zuordnung der Kittsubstanz zu einer bestimmten chemischen Stoffklasse näher zu definieren.

Material und Methoden

Die Trommelfelle von acht Frauen und zwölf Männern im Alter von zehn bis vierundachtzig Jahren wurden 12 bis 24 Stunden nach dem Tode herauspräpariert und untersucht. Das Material wurde teils unfixiert, teils formfixiert auf dem Gefriermikrotom 5μ dick geschnitten. Die anschließende Beschallung mit hochfrequentem Schall wurde einmal kurz und einmal länger ausgeführt, um eventuelle Unterschiede erfassen zu können. Die Beschallung erfolgte in einem Siemens-Beschallungsgerät (WOLFF) bei einer Frequenz von etwa 10 kHz (Schnitt-Schall-Präparation nach WOLPERS).

Ein Teil des Materials, das in frischem Zustand der Schnitt-Schallpräparation unterworfen wurde, ist anschließend entweder $1\frac{1}{2}$ oder 39 Stunden mit Osmiumdampf fixiert worden. Ein anderer Teil wurde der Einwirkung von Trypsin oder Hyaluronidase (Apertase¹) ausgesetzt. Trypsin wirkte bei 37° 111 Stunden ein (fünfmal gewechselt), Hyaluronidase bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung 87 Stunden (fünfmal gewechselt). Kontrollversuche ohne Enzyme liefen parallel. Außerdem wurde die Bindegewebsversilberung nach GÖMÖRI ausgeführt. Einige Präparate des formfixierten Materials wurden mit Wolframoxyd schräg bedampft²). Sämtliche Aufnahmen sind mit dem Siemens-Überrückprojektor Typ 100 b bei einer Strahlspannung von 80 kV gemacht worden.

¹) Für die Überlassung der Apertase danke ich Herrn Dr. KRAHL von der Firma Höchst-Farbwerte AG.

²) Fräulein Dr. A. D'ANS danke ich für die Ausführung der Bedampfung.

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Trommelfelle in Carnoy oder Bleiacetat (LISON: ROMEIS 1948) fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 10μ Schnitte wurden entparaffiniert und mit folgenden Farbstoffen behandelt: Wäßrige Lösung von 0,001% Toluidinblau, wäßrige Lösung von 0,1% Kresylviolett R, wäßrige Lösung von 0,005% Gentianaviolett und wäßrige Lösung von Heldschem Hämatoxylin. Außerdem wurde die Carmin-Färbung nach BEST, die Elastica-Färbung nach WEIGERT und die Versilberung nach GÖMÖRI vorgenommen.

Die Einwirkung des Fermentes Hyaluronidase auf die Substantia propria des Trommelfells wurde auch an histologischen Präparaten untersucht.

Befunde

Erfahrungsgemäß unterscheiden sich Elektronenbilder von formolfixiertem und unfixiert aufgetrocknetem Material nur wenig. Ich habe daher auf die Abbildung eines unfixierten Objektes verzichtet und lege der ersten Beschreibung der Befunde in Bild von formolfixiertem Material zugrunde.

In der Mitte der Abbildung 1 sieht man einen Gewebsetzen der Substantia propria mit relativ scharfen Kanten. Diese Kanten entsprechen den Schnittebenen des Mikrotommessers. Die Breite des hier abgebildeten Stückes entspricht also etwa der Dicke des Gefrierschnittes. Bei kurzer Beschallung, in diesem Fall 5 Minuten, findet man öfteren solche Gewebsstücke. An ihnen kann man einen gewissen Aufschluß über die Topographie der Fibrillen innerhalb des Gewebsverbandes gewinnen. Die genauen topographischen Beziehungen einzelner Gewebelemente zueinander sind normalerweise nur an unbeschallten Gewebsschnitten zu klären. Da die Substantia propria, wie jedes andere feste Bindegewebe, sehr dicht ist, kann sie im Elektronenmikroskop nur an Schnitten von unterhalb $0,1\mu$ Dicke durchstrahlt werden, deren Anfertigung uns noch nicht möglich war.

Die Beschallung des Gewebes zerstört im allgemeinen seine Topographie, da der Schall unter Zerstörung der Zellen das Gewebe bis zu den einzelnen Fibrillen zerzupft. Die Wirkung des Schalles ist einmal natürlich abhängig von seiner Dauer und Intensität, andererseits auch von der Beschaffenheit der interfibrillären Kittsubstanz, die die Fibrillen mehr oder weniger stark zusammenhält.

Die Gewebsfragmente lassen den Rückschluß zu, daß die Kittsubstanz der Propria eine sehr feste Verbindung des Fibrillen- und Faserverbandes darstellt, die auch durch längere Schalleinwirkung nur bedingt zu zerstören ist.

In der Abb. 1 sieht man innerhalb des Gewebsstückes größere Mengen einer elektronenmikroskopisch amorphen Substanz, die sich zwischen den geformten Elementen (Fasern und Fibrillen) befindet und im Durchstrahlungsbild relativ dicht erscheint. Weiterhin erkennt man innerhalb des Gewebsstückes mehrere Fibrillenbündel (Fasern), die als dunklere Stränge imponieren. Diese Fibrillenbündel dürften den Fasern des histologischen Bildes entsprechen, die allgemein als Kollagenfasern beschrieben worden sind. Sie sind von wechselnder Dicke ($0,2-0,8\mu$) und verlaufen im wesentlichen in einer Vorzugsrichtung. Es dürfte sich hier um die Radiärfasern des Trommelfells handeln. In allen von mir beobachteten Gewebsstücken waren keine Fasern senkrecht zu dieser Vorzugsrichtung zu erkennen, die man als Zirkulärfasern bezeichnen könnte. Allerdings berechtigen die an Gewebsfragmenten erhobenen Befunde nicht zu der Annahme, daß Zirkulärfasern vollkommen fehlen. Im histologischen Präparat sind sie auch nur spärlich vorhanden. Es würde daher ein Glücksunstand sein, in einem elektronenmikroskopischen Präparat unserer Behandlungstechnik ein Gewebsstück mit Zirkulärfasern anzutreffen. Die in Abb. 1 senkrecht zur Vorzugsrichtung liegende Faser könnte durch die Auftrocknung sekundär horizontal angeagert worden sein.

An einigen Stellen des Gewebsfragmentes erkennt man, daß die dunklen Stränge (Fasern) aus Fibrillen zusammengesetzt sind. Ihre Beschaffenheit läßt sich gut beurteilen an den Fibrillen, die durch die Schalleinwirkung aus dem Gewebsverband herausgezupft worden sind und einzeln auf dem Trägerfilm der Objektblende liegen. Die Dicke dieser Fibrillen schwankt zwischen 23—58 m μ , ihr Mittelwert beträgt 40 m μ . Die Fibrillen zeigen eine Querstreifungsperiode, die jeweils aus einem dunklen D-Teil und einem hellen H-Teil besteht. Die Periodenlänge schwankt zwischen 46—75 m μ , ihr Mittelwert liegt bei 69 m μ . Die Querstreifungsperiode der Trommelfellfibrille entspricht etwa der Periode einer Kollagenfibrille, wie sie röntgenspektrographisch durch BEAR (1942) und elektronenmikroskopisch zuerst von SCHMITT, F. O., HALL und JAKUS (1942) und unabhängig davon von WOLPERS (1943) nachgewiesen wurde.

Aus der Abb. 1 geht hervor, daß die Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells zu Bündeln geordnet sind, die in einer bestimmten Vorzugsrichtung verlaufen. Die Zusammenfassung der Fibrillen zu Bündeln (Fasern), sowie die Verbindung der Fasern untereinander erfolgt durch eine elektronenmikroskopisch amorphe Kittsubstanz.

Die Beurteilung der Kittsubstanz ist nach Metallbedampfung noch besser möglich. Zu beachten ist, daß vor allem die Oberflächen des Objektes dargestellt werden, während die Innenstrukturen weniger zur Abbildung gelangen. Ein Vorteil dieser Methode ist neben der Prägnanz des Bildes die Möglichkeit, bei bekanntem Bedampfungswinkel die Höhe des abgebildeten Objektes zu bestimmen. Die Abb. 2 zeigt ein derartiges Bild, das mit Wolframoxyd schräg bedampft wurde. Es ist hier ebenfalls neben isolierten Fibrillen ein Gewebstück zu sehen, das ungefähr dem in Abb. 1 gezeigten entspricht. Auch hier erkennt man zwischen den Fibrillen die amorphe Kittsubstanz. Allerdings scheint das Gefüge des Gewebstückes schon etwas mehr gelockert, als es auf Abb. 1 der Fall ist.

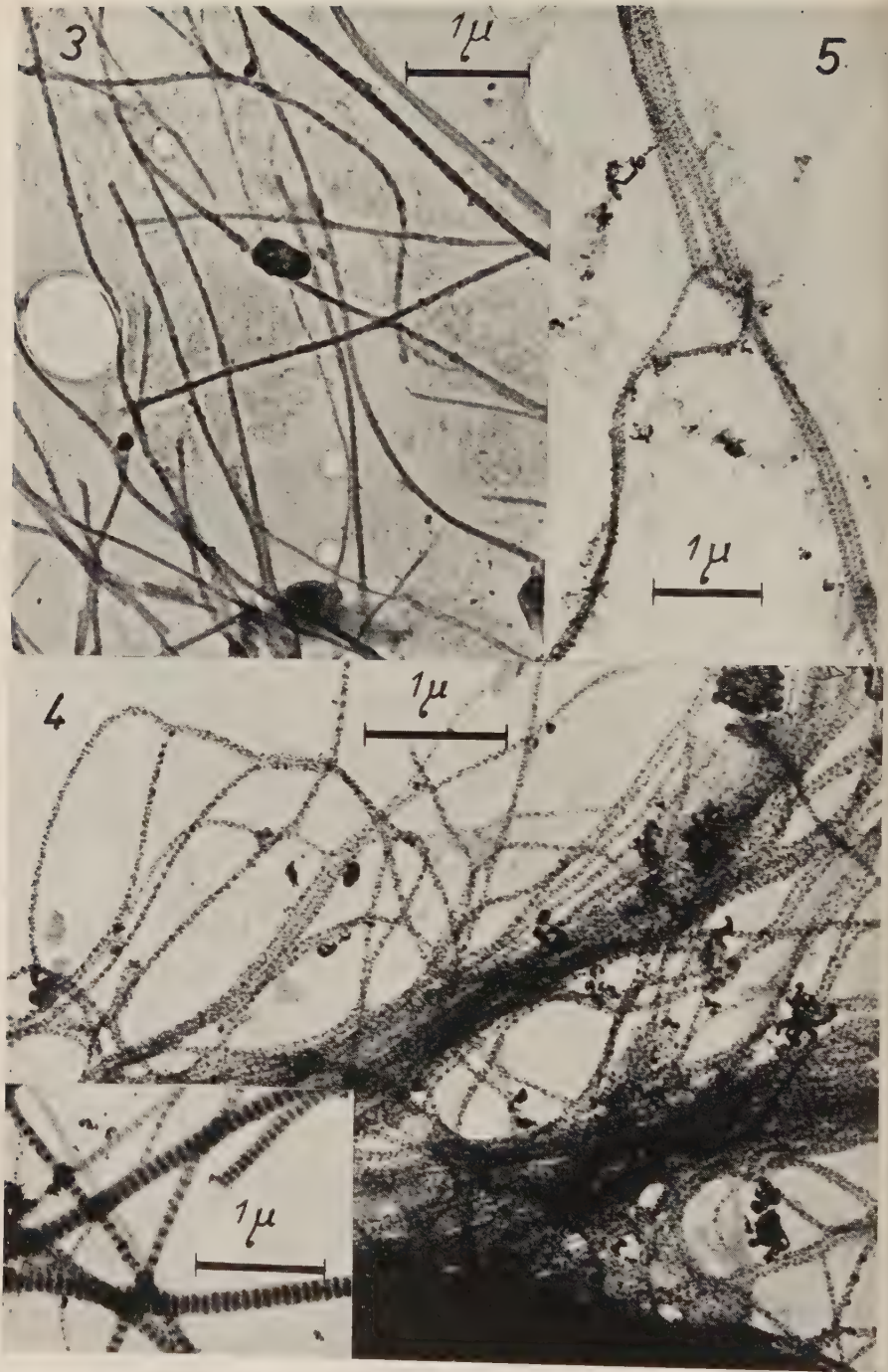
Die Querstreifung der Fibrillen wird auch bei dieser Methode sichtbar. Die etwas vorgewölbten Abschnitte der Fibrillenoberfläche entsprechen dabei den D-Teilen. Auch dieser Befund ist von der Kollagenfibrille her bekannt. An manchen Stellen lassen die Fibrillen keine deutliche periodische Vorwölbung erkennen, sondern erscheinen mehr als glatte Stränge. Ich möchte annehmen, daß hier die Fibrillen von einem dünnen Mantel von Kittsubstanz umgeben sind. Wenn man das Präparat länger beschallt, dann verschwindet auch dieser Kittsubstanzmantel und überall ist die Periode zu erkennen.

Die Abb. 3 zeigt die Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells, die mit Osmiumtetroxyd behandelt worden sind. Über die Faktoren, die zur Anreicherung der Schwermetallverbindungen in bestimmten Objektteilen führen, ist wenig bekannt. Die genannten Schwermetallverbindungen sind „weit davon entfernt, spezifisch zu sein“ (GROSS, 1950). An manchen Stellen erkennt man in der Mitte der dunklen „gefärbten“ D-Teile einen etwas helleren Streifen, der dem γ -Stück der osmiumfixierten Kollagenfibrille entspricht (WOLPERS, 1943). Die Fibrillen zeigen an ihren Enden meist glatte Abbruchstellen. Eine Auffaserung in Filamente (SCHMITT, F. O., 1951) ist nicht zu erkennen. Es sind jedoch im Bildausschnitt einige extrem dünne Fibrillen zu sehen, die man vielleicht als „Protofibrillen“ oder Filamente ansprechen kann. Auch diese Protofibrillen zeigen eine Unterteilung in dunklere und hellere Abschnitte, ohne daß sich eine genaue Periode festlegen läßt. Zwischen den Fibrillen ist stellenweise amorphe Substanz aufgetrocknet, die man wohl als Rest von Kittsubstanz ansprechen kann. Von einem Kittsubstanzmantel um die Fibrillen herum ist nichts zu erkennen. Dies dürfte auf die lange Beschallung des Objektes (30 Minuten) zurückzuführen sein.



Abb. 1. Gewebsfragment und isolierte Fibrillen aus der Substantia propria des menschlichen Trommelfells. Fix. Formol, 5 Min. beschallt, Vergrößerung 17 400 : 1

Abb. 2. Gewebsfragment und isolierte Fibrillen aus der Substantia propria des menschlichen Trommelfells. Fix. Formol, 5 Min. beschallt, mit Wolframoxyd schräg bedampft. Vergrößerung 17 400 : 1



Erläuterungen zu den einzelnen Abbildungen nächste Seite unten

Eine Differenzierung von Fibrillen ist mit den bisher von mir angeführten Methoden nicht möglich. Alle Fibrillen des Bindegewebes, sei es Kollagen, Retikulin (E. VON HERRATH und N. DETTMER, 1951, F. WASSERMANN, 1951) oder Material aus elastischem Gewebe (N. DETTMER, 1952) weisen die gleiche charakteristische Querstreifungsperiode auf.

Aus der Histologie sind nun aber einige Differenzierungsmöglichkeiten von Bindegewebskomponenten bekannt. Eine dieser Möglichkeiten ist die Versilberung nach EISELSCHOWSKY, die von GÖMÖRI 1937 modifiziert worden ist. Nach dieser Methode färbt sich Kollagen im Lichtmikroskop rotbraun dar, während Gitterfasern (retikuläre Fasern) schwarz imponieren. Aus dieser Eigenschaft der Gitterfasern leitet sich auch ihre Bezeichnung „argyrophile“ Fasern ab. Die GÖMÖRI-Methode macht auch in der Elektronenmikroskopie eine Differenzierung der Bindegewebsfibrillen möglich. So zeigt das Sehnen-Kollagen eine Innenversilberung der D-Teile, während die H-Teile keine oder nur unwesentliche Silbermengen aufnehmen (N. DETTMER, I. NECKEL und H. RUSKA, 1951). Die Silberpartikel innerhalb der D-Teile der genannten Kollagenfibrillen sind sehr klein und liegen teilweise unterhalb der elektronenmikroskopischen Auflösungsgrenze. Bei einem derartigen Versilberungsmodus resultiert eine außerordentlich kontrastreiche Querstreifung der Fibrillen. Die Fibrillen des retikulären Gewebes lassen dagegen nach Versilberung keine Querstreifung mehr erkennen. Bei ihnen lagert sich das Silber an der Fibrillenoberfläche ab. Man bezeichnet diese charakteristische Form der Versilberung im Gegensatz zur Innenversilberung der Kollagenfibrillen als Oberflächenversilberung (E. VON HERRATH und N. DETTMER, 1951). Die Silberteilchen sind hier wesentlich größer. Sie liegen teilweise in Gruppen geordnet, die manchmal mit der Querstreifung der Fibrillen in Zusammenhang zu stehen scheinen. Von der genuinen Querstreifung der Fibrille (D- und H-Teil) ist jedoch nichts mehr zu sehen, sie scheint bei der Versilberung verloren zu gehen.

Um die Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells mit den bisher untersuchten Bindegewebsfibrillen in Beziehung setzen zu können, habe ich ebenfalls die Versilberungsmethode nach GÖMÖRI angewendet. Die Abb. 4 gibt einen Ausschnitt aus einem solchen versilberten Präparat wieder. Man sieht ein sich aufzweigendes Bündel von Fibrillen, zwischen denen an einigen Stellen noch Kittsubstanz zu erkennen ist. Die Kittsubstanz scheint frei von Silber zu sein. Die Fibrillen zeigen eine Auflagerung von deutlich erkennbaren Silberkörnern an ihrer Oberfläche. An einzelnen Stellen sind die Auflagerungen in Gruppen geordnet. Man gewinnt den Eindruck, daß die Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells im wesentlichen eine Außenversilberung zeigen. In anderen Objektausschnitten (Abb. 5) findet man Fibrillen, deren Außenversilberung nicht so stark ausgeprägt ist wie in Abb. 4. Sie weisen eine gewisse Periodizität der Silberablagerungen auf und haben daher entfernt

Abb. 3. Isolierte Fibrillen der Substantia propria des menschlichen Trommelfells. 39 Stunden in Osmiumtetroxyddampf fixiert. 30 Min. beschallt, Vergrößerung 17100 : 1

Abb. 4. Fasern aus der Substantia propria des menschlichen Trommelfells, z. T. in Fibrillen aufgespalten. Fix. Formol, 5 Min. beschallt, Versilberung nach GÖMÖRI, 5 Min. beschallt. Vergrößerung 20000 : 1. Am unteren Rande einige nach GÖMÖRI versilberte Kollagenfibrillen der menschlichen Sklera. Vergrößerung 18000 : 1.

Abb. 5. Einige Fibrillen der Substantia propria des menschlichen Trommelfells mit angedeuteter Innenversilberung. Fix. Formol, 5 Min. beschallt. Versilberung nach GÖMÖRI, 5 Min. beschallt. Vergrößerung 15000 : 1

Ähnlichkeit mit Kollagenfibrillen. Ob diese Silberablagerungen innerhalb oder außerhalb der Fibrillen liegen, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden. Es scheint mir aber so, als ob sowohl Innen- wie Außenversilberung vorhanden ist.

Die versilberten Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells nehmen damit eine Stellung zwischen Retikulin und Kollagen ein. Ihre Außerversilberung erinnert an den Versilberungsmodus des Retikulins, jedoch sind die Silberablagerungen wesentlich mehr in Form von Perioden angeordnet, als es bei den retikulären Fibrillen der Fall ist. Ab und zu scheint sogar eine angedeutete Innenversilberung vorhanden zu sein, die für Kollagenfibrillen charakteristisch ist. Allerdings ist sie in den Kollagenfibrillen des reifen Sehngewebes wesentlich klarer abgegrenzt und stärker ausgeprägt als in den Fibrillen meines Objektes.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ist außerdem noch die Frage nach der Beschaffenheit der Kittsubstanz zu klären. Die Kittsubstanz des Bindegewebes besteht nach allgemeiner Ansicht aus Eiweißkomponenten und einem wechselnden Anteil hochpolymerer Polysaccharide. Von den in der Kittsubstanz vorkommenden Polysacchariden sind uns einige in ihrer Konstitution bekannt. Es sind dies die Chondroitinschwefelsäure, die Hyaluronsäure und die Hyaluronschwefelsäure (K. MEYER, 1947). Vermutlich gibt es auch noch andere, chemisch bisher noch nicht erfaßte Polysaccharide im Gewebe (GROSS, 1950). Die in der Kittsubstanz vorkommenden Eiweiße sind bisher nicht definiert worden. Es ist daher sehr schwierig, über die Zusammensetzung der Kittsubstanz an Hand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen Aufschluß zu gewinnen. Hier bleibt nur die Möglichkeit, mit bestimmten Fermenten die eine oder die andere Komponente der Kittsubstanz aus dem Objekt herauszulösen. Die Verminderung oder das Verschwinden dieser Komponente kann dann unter Umständen elektronenmikroskopisch erfaßt werden. Ein Fermentkomplex, der die bisher bekannten, in der Kittsubstanz vorkommenden Polysaccharide abbaut, ist die Hyaluronidase. Ich habe sie daher auf die Substantia propria des Trommelfells einwirken lassen, um eventuell vorhandene Polysaccharide herauszulösen. Ein merkbarer Effekt war bei unserem Material nicht zu verzeichnen. Daraus könnte der Schluß gezogen werden, daß entweder in der Substantia propria nur geringe Mengen von Polysacchariden vorhanden sind, oder diese in einer Form vorkommen, die durch Hyaluronidase-Einwirkung nicht abgebaut werden kann.

Auch die längere Einwirkung von Trypsin (144 Stunden) hatte keinen Effekt. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als die Kittsubstanz des Sehnenkollagens durch Trypsin abgebaut wird. Die Kittsubstanz der Substantia propria des Trommelfells ist daher weder mit der Kittsubstanz des Sehnenkollagens zu vergleichen, noch mit der der Cornea, welche durch Einwirkung von Hyaluronidase wenigstens z. T. abgebaut wird. Weitere Aussagen über die Beschaffenheit der Kittsubstanz lassen sich z. Zt. noch nicht machen.

Die histologischen Untersuchungen wurden lediglich zur Erhärtung der elektronenmikroskopischen Befunde herangezogen. Bei der Färbung von Paraffinschnitten des Trommelfells mit den bereits erwähnten metachromatischen Farbstoffen zeigt sich eine schwache Metachromasie, die durch Hyaluronidase-Einwirkung nicht wesentlich zu verändern ist. Dieser Befund entspricht den schon am Elektronenbild erhobenen Vermutungen. Die Versilberung nach GÖMÖRI am histologischen Präparat ergibt eine diffuse rotbraune Tönung der Substantia propria. Hier ist zu sagen, daß der gleiche Farbton eines versilberten Präparates im histologischen Bild nicht immer dem gleichen Versilberungsmodus der Fibrillen entspricht. Es hat sich z. B. gezeigt, daß die Cornea einen „metachromatisch“ rötlichen Farbton annimmt. Ebenso versilbert sich das Sehnenkollagen „metachromatisch“ rotbraun. Die elektronenmikro-

skopischen Untersuchungen dieser beiden Objekte (SCHWARZ, 1952) hat indessen ergeben, daß beide einen völlig verschiedenen Versilberungsmodus der Fibrillen aufweisen. Aus dieser Tatsache geht hervor, daß der Ausfall der Versilberung am histologischen Präparat keinen sicheren Rückschluß auf den Versilberungsmodus und damit auf die Beschaffenheit der Fibrillen zuläßt. Die Größe der erzeugten Silberpartikel kann verständlicherweise je nach der technischen Ausführung der Versilberung schwanken, nicht aber die jeweils spezifische Lage der Silberteilen. Dies gilt auch für die Versilberung der Substantia propria des Trommelfells. Nach der Versilberung des histologischen Schnittes könnte man die Fasern für Sehnenkollagen halten. Der elektronenmikroskopische Befund dagegen zeigt, daß die Fibrillen der Substantia propria nicht mit denen des reifen Sehnenkollagens auf eine Stufe gesetzt werden können. Durch die charakteristischen Differenzierungsmöglichkeiten im Elektronenbild an Hand der GÖMÖRI-Methode ist klar herausgestellt, daß lichtmikroskopische Befunde im histologischen Schnitt bei gleicher Versilberung keine endgültige Klärung über die Morphologie der Fasern geben können.

Mit Resorcin-Fuchsin nach WEIGERT habe ich am Rande des Trommelfells im histologischen Schnitt einige elastische Fasern färberisch darstellen können. Diese Fasern sind im Elektronenbild niemals zur Darstellung gekommen. Es ist bei der WEIGERT-Färbung, wie auch bei allen anderen Elastica-Färbungen, allerdings die Frage, ob mit dieser Färbung wirklich nur elastische Elemente erfaßt werden. Nach v. MÖLLENDORF und DÖRLE (1923) ist der Ausfall dieser Färbung im wesentlichen von der Dichte des angefärbten Objektes abhängig. Es handelt sich also bei den Elastica-Färbungen nicht um unbedingt spezifische Methoden, sondern um ein physikalisch-chemisches Phänomen. Inwieweit es sich bei den angefärbten Strukturen wirklich um Elastin handelt, möchte ich dahingestellt sein lassen. Gerade beim Trommelfell ist durchaus die Möglichkeit gegeben, daß die Kittsubstanz in ihrer Dichte an einigen Stellen der Dichte des elastischen Gewebes gleichkommt und daher durch die Elastica-Färbung dargestellt werden kann.

Relativ viel hochpolymere Kittsubstanz im Trommelfell, gleichmäßig dicke Fibrillen, kein wesentlicher Unterschied zwischen den Brechungsindices von Fibrillen und Kittsubstanz erklären nicht nur die Transparenz und Konsistenz dieses Gewebes, sondern dürften auch für die Funktion des Trommelfells von Bedeutung sein.

Zusammenfassung

Die Grundsubstanz der Substantia propria des menschlichen Trommelfells wurde elektronenmikroskopisch nach dem Schnitt-Schall-Verfahren und lichtmikroskopisch untersucht.

Die Relation zwischen Fibrillen und Kittsubstanz, sowie die Morphologie der Fibrillen und ihre Beziehung zu den bisher untersuchten Bindegewebsfibrillen wurden beschrieben. Weiterhin wurde versucht, über die Beschaffenheit der Kittsubstanz Aufschluß zu gewinnen.

Das Elektronenbild von formfixiertem Material zeigt die Fibrillen der Substantia propria zu Bündeln (Fasern) geordnet und in einer bestimmten Vorzugsrichtung verlaufend. Diese Fibrillenbündel dürften den Fasern des histologischen Bildes entsprechen. Ihre Dicke beträgt $0,2 - 0,8 \mu$. Die einzelne Fibrille hat eine Dicke zwischen 23 und $58 m\mu$, der Mittelwert liegt bei $40 m\mu$. Die Fibrillen zeigen eine Querstreifungsperiode (D- und H-Teil). Die Periodenlänge beträgt im Mittel $69 m\mu$ und schwankt zwischen $46-75 m\mu$. Eine elektronenmikroskopisch amorphe Kittsubstanz faßt die Fibrillen zu Bündeln (Fasern) zusammen und bewirkt die Ver-

bindung der Fasern untereinander. An dem mit Wolframoxyd bedampften Objekt werden diese Verhältnisse besonders deutlich demonstriert.

Um den Kontrast der Fibrillen zu erhöhen, wurde Fixierung mit Osmiumtetroxyd-Dampf angewendet. Die Querstreifung der Fibrillen erscheint dabei deutlicher.

Zur Differenzierung der Fibrillen im elektronenmikroskopischen Bild wurde die Versilberung nach GÖMÖRI durchgeführt. Die Fibrillen der Substantia propria des Trommelfells nehmen eine Stellung zwischen Retikulin und Kollagen ein. Ihre Außenversilberung erinnert an den Versilberungsmodus des Retikulins, ihre manchmal angedeutete Innenversilberung ist wiederum für die Kollagenfibrillen charakteristisch. Die Beschaffenheit der Kittsubstanz wurde untersucht. Sie zeigt ein Verhalten, das von dem der bisher untersuchten Kittsubstanzen abweicht. Einwirkungen von Hyaluronidase und Trypsin blieben ohne Effekt.

Histologisch wurde mit metachromatischen Farbstoffen eine schwache Metachromasie der Substantia propria gefunden, die durch Hyaluronidase-Einwirkung nicht wesentlich zu verändern war. Die Befunde am histologischen und elektronenmikroskopischen Präparat bei der Anwendung der Versilberungsmethode nach GÖMÖRI werden diskutiert.

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. W. SCHWARZ.

Schrifttum

- BEAR, R. S.: J. amer. chem. Soc. **64**, 727 (1942). — DETTMER, N., I. NECKEL und H. RUSKA: Z. wiss. Mikrosk. **60**, 290 (1951). — DETTMER, N.: Z. Zellforschg. **37**, 89 (1952). — FILAGAMO, G.: Acta anatom. **7**, 248 (1949). — GÖMÖRI, G.: Americ. J. Path. **13**, 993 (1937). — GROSS, J.: J. off. Gerontol. **5**, Nr. 4 (1950). — HERRATH, E. von, und DETTMER, N.: Z. wiss. Mikrosk. **60**, 282 (1951). — KOLMER, W.: In v. Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie Bd. **111**, 1 (1927). — MEYER, K.: Physiol. Rev. **27**, 335 (1947). — MÖLLENDORFF, W. von, und M. DÖRLE: Arch. mikrosk. Anat. u. Entw. mechan. **100**, 61 (1923). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik 1948. — SCHAFFER, J.: Lehrbuch der Histologie und Histogenese, 3. Aufl. 1933. — SCHMITT, F. O., C. E. HALL und M. A. J. JAKUS: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **20**, 11 (1942). — SCHMITT, F. O.: J. Amer. Leather Chem. Assoc. XLVI, No. 10 (1951). — SCHWARZ, W.: Z. Zellforschg. **38**, 26 u. 78 (1953). — SECONDI, U.: Arch. of Otolaryng. **53**, 170 (1951). — VARAGLIA, Arch. ital. di otol., rinol. e laryngol. **9** (1899). — WASSERMANN, F.: Anatom. Rec. **111**, No. 2 (1951). — WATSUJI: Zeitschrift für Ohrenheilk. **47**, 142 (1903). — WOLFF, O.: Z. wiss. Mikrosk. **61**, 180 (1952). — WOLPERS, C.: Klin. Wschr. **1943**, 624; Virchow's Arch. **312**, 292 (1944), Leder **1,3** (1950).

[Eingegangen am 23. Dezember 1952]

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Porzellanoberflächen

Von **Margarete Hartmann-Fahnenbrock^{*)}** und **Walter Kling^{**)}**

(Mit 5 Tafeln)

Über das Aussehen von Porzellanoberflächen unter dem Elektronen-Mikroskop ist bisher nichts bekannt geworden. Es erschien daher interessant, solche Oberflächen im Ausgangszustand und in verschiedenen Stadien des Gebrauchs zu untersuchen und dabei, soweit möglich, die Einwirkungen verschiedener Spülverfahren und Spülmittel zu kontrollieren.

1. Aufnahmetechnik

Um ein richtiges Durchschnittsbild zu gewinnen, kamen jeweils mehrere Gegenstände derselben Art zur Untersuchung. Von zahlreichen, durch Schablonen einigermaßen festgelegten Stellen der Oberflächen wurden Abdrucke nach einem von A. F. BROWN und W. M. JONES¹⁾ angegebenen und von S. MENNENÖH und M. FAHNENBROCK²⁾ verbesserten Verfahren hergestellt. Auf die ausgewählten Stellen wurde Methacrylnitromethylester (Plexiglas^{***})) aufgegossen und die erhaltene Matrice nach Polymerisation über Nacht mit Siliciummonooxyd schräg bedampft. Die nach Auflösen des Polymethacrylats in Toluol oder Trichloräthylen zurückbleibende SiO₂-Haut konnte dann im Elektronen-Mikroskop untersucht werden. Gearbeitet wurde mit Siemens Übermikroskopen nach RUSKA und v. BORRIES; zur Auswertung wurden insbesondere solche Aufnahmen herangezogen, auf denen kleine Fremdkörper, die auf der Matrice lagen und mit bedampft wurden, als schwarzes Abbild zu erkennen sind. Sie erlauben es, die Bedampfungsrichtung festzustellen und damit zu entscheiden, ob es sich bei Unebenheiten um Erhebungen oder Vertiefungen handelt. In einigen Fällen wurde zur Klärung dieser Frage zusätzlich ein Kunstgriff, nämlich das Aufräumen von Magnesiumoxyd, verwendet. Trotzdem ließ sich aus den Bildern allein nicht immer eine völlig eindeutige Vorstellung gewinnen, ob Korrosionen der Oberfläche oder irgendwelche Auflagerungen vorlagen, weil die Ausgangsoberfläche nicht mehr mit Sicherheit festzustellen war.

2. Untersuchungen an glatten Porzellanoberflächen (Tellern)

Für diese Untersuchungen wurde eine größere Anzahl von Tellern aus gewöhnlichem, glatt-weißen Gebrauchsporzellan gleicher Provenienz direkt aus dem Handel beschafft.

^{*)} Rhein.-Westf. Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf.

^{**)} Böhme Fettchemie GmbH., Düsseldorf.

^{***}) Hersteller: Röhm & Haas, GmbH., Darmstadt.

¹⁾ Nature **159** (1947) S. 633.

²⁾ Z. wiss. Mikroskopie **60** (1951) S. 203.

Die ungebrauchten Teller zeigten eine weitgehend glatte Oberfläche. Dennoch waren die Aufnahmen, welche keinerlei Einzelheiten zeigten, in der Minderzahl. Im allgemeinen sind zu sehen:

- a) kalottenförmige Erhebungen, möglicherweise herrührend von nicht völlig durchgeschmolzenen Körnern der Glasur — Bild 1 (6339/50)
- b) Furchen in der Oberfläche — Bild 2 (6164/50)
- c) Vertiefungen und Erhebungen unregelmäßiger Art — Bild 3 (6250/50)
- d) Verletzungen offensichtlich mechanischer Art — Bild 4 (6041/50)
- e) Gebietsmäßig abgegrenzte Aufrauungen — Bild 5 (4961/50)
- f) Luftblasen, die sich zwischen Teller und Matrize gebildet haben und durch ihre Strukturlosigkeit von Erhebungen nach a) zu unterscheiden sind
- g) die angeführten Erscheinungen nebeneinander — Bild 6 (6313/50).

Längere Zeit im Haushalt gebrauchte Teller zeigten schon mit freiem Auge erkennbare matte Stellen. Diese treten insbesondere dort auf, wo die Teller beim Stapeln im Schrank aufeinanderstehen und dort, wo sie durch das Hantieren mit Messer, Gabel und Löffel mechanisch beansprucht werden. Unter dem Elektronen-Mikroskop waren an diesen matten Stellen stärkere Unebenheiten zu erkennen, welche augenscheinlich dadurch entstanden sind, daß Teile der obersten Schicht in unregelmäßigen Formen scharfkantig ausgebrochen sind — Bilder 7 und 8 (4962/50 und 4964/50).

Zum Vergleich wurden Teller durch längeres Kochen in alkalischer Lösung absichtlich stärker chemisch beansprucht. Auch in diesem Falle waren unter dem Elektronen-Mikroskop deutliche Veränderungen der Oberfläche zu erkennen, welche jedoch mehr abgerundete Formen zeigten und sich dadurch von den mechanischen Schäden deutlich unterscheiden ließen — Bild 9 (1352/51). Bild 10 (1276/51) zeigt noch deutlicher die charakteristisch eisblumenähnliche Anordnung dieser chemischen Korrosionen.

Weiter war die Aufgabe gestellt, den Einfluß neutraler Spülmittel zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden Teller fünfzigmal mit Pril****) gespült, einem Produkt, das als grenzflächenaktiven Anteil eine Kombination von primären Alkylsulfaten entsprechend der allgemeinen Formel $C_nH_{2n-1}OSO_3Na$ und von Alkylbenzolsulfonaten der allgemeinen Formel $C_nH_{2n-1}C_6H_4SO_3Na$ sowie aus der Herstellung anorganischer Salze, insbesondere Natriumsulfat, enthält. Die Bilder 11 bis 14 (1604/51, 1611/51, 1625/51, 2077/51) von Oberflächen so behandelter Teller zeigen in Vergleich zu den Bildern 1 bis 6 von unbehandelten Tellern, daß der Ausgangszustand bei einem Spülen mit derartigen neutralen Spülmitteln ebenso wie bei einer Behandlung mit bloßem Wasser, keine sichtbaren Veränderungen erfährt.

3. Untersuchungen an vergoldeten Porzellanoberflächen (Tassen)

Die Untersuchungen wurden noch auf empfindlicheres Porzellan ausgedehnt, und zwar auf Kaffeetassen, die an der Innenseite einheitlich vergoldet waren. Die Untersuchungstechnik blieb dabei dieselbe. Die Bilder 15 bis 17 (5123/52, 5118/52, 5101/52) zeigen die Oberfläche des Golddekors von neuen, ungebrauchten Tassen. Sie weist im Gegensatz zu der Oberfläche der weißen Teller eine durchgehende Strukturierung auf. Vorzugsweise sieht man schwach ausgeprägte parallele Rillen — Bilder 15 und 16. In Einzelfällen eine mehr körnige Struktur — Bild 17. Es dürfte die Annahme berechtigt sein, daß die Rillen mit der Art des Aufbringens des Dekors ursächlich

****) Hersteller: Böhme Fettchemie GmbH., Düsseldorf.

zusammenhängen. Ein fünfzigmaliges Spülen der Tassen mit Wasser allein oder mit einem neutralen Spülmittel brachte keine Veränderungen dieser Oberfläche und zwar unabhängig davon, ob beim Spülen in üblicher Weise mit einem Lappen oder ohne mechanische Behandlung gearbeitet wurde. Die Bilder 18 bis 20 (6619/52, 6626/52, 602/52) von unter Zusatz von Pril in üblicher Weise behandelten Tassen zeigen keinen Unterschied gegenüber dem Ausgangszustand.

4. Untersuchungen auf Rückstände aus den Spülbädern

Beim Arbeiten mit modernen Geschirrspülmitteln ist es bekanntlich üblich, das Spülwasser, welches durch den Zusatz von grenzflächenaktiven Verbindungen eine starke Erniedrigung der Oberflächenspannung erfahren hat und — volkstümlich ausgedrückt — „entspannt“ worden ist, einfach ablaufen zu lassen und das Geschirr nicht abzutrocknen. Es war daher von Interesse, neben den vorstehenden Untersuchungen über Veränderungen der Oberfläche zu prüfen, ob auf so gespülten Gegenständen Rückstände von Spülmitteln elektronenmikroskopisch zu finden sind.

Die Bilder 11 bis 14 und 18 bis 20 zeigen bereits, ebenso wie zahlreiche hier nicht veröffentlichte weitere Aufnahmen, daß im allgemeinen von Spülmittelrückständen nichts zu sehen ist. Um solche absichtlich vorzuführen, wurden feuerpolierte Glasplatten mit Pril gespült und zum Trocknen aufgestellt. Man findet dann manchmal an dem unteren Rand der Platten Ablaufstellen, an denen die Scheiben einen trüben Belag aufweisen. Untersucht man solche Stellen im Abdruckverfahren oder Aufnahmen von Spülbädern auf dünnen SiO-Häuten direkt, dann kann man verschiedenartige Auflagerungen sehen. Bild 21 (6209/51) zeigt zunächst nicht näher definierbare schmierige Rückstände. Bei den Bildern 22 (6200/51), 23 und 24 (6667/51 und 6676/51) kann man dagegen vermuten, daß Reste der organischen Wirksubstanz gefaßt worden sind. Jedenfalls ist bekannt, daß primäre Alkylsulfate in kleinen Blättchen wie sie Bild 24 wiedergibt, kristallisieren. Die Bilder 25 und 26 (6798/51 und 6807/51) schließlich bringen mit großer Wahrscheinlichkeit Mikrokristalle von anorganischen Salzen.

Die beschriebenen Rückstände sind beschränkt auf solche Fälle, wo das Abfließen der letzten Tropfen am unteren Rande der gespülten Stücke behindert ist und nicht ordnungsgemäß erfolgen kann. Das von uns nachgewiesene Fehlen von Rückständen auf den großen, zum Essen benutzten Flächen des Porzellans steht in bester Übereinstimmung mit gravimetrischen Untersuchungen von G. LIETZ. Dieser ermittelte, daß die Mengen an Spülmittelrückständen, welche in einem Durchschnittshaushalt über das Geschirr aufgenommen werden können, in der Größenordnung von 0,1 g pro Person und Jahr liegen.

Zusammenfassung

Es wurden Oberflächen von Tellern aus normalem weißen Gebrauchsporzellan im Ausgangszustand, nach längerem Gebrauch, d. h. mechanischer Beanspruchung, nach stärker alkalischer Behandlung, d. h. chemischer Beanspruchung, und nach wiederholtem üblichen Spülen elektronenmikroskopisch geprüft:

1. Im Ausgangszustand ist die Oberfläche überwiegend glatt mit vereinzelt verschiedenen gestalteten Unebenheiten.
2. Die mechanische Beanspruchung beim Gebrauch der Teller ist deutlich erkennbar. Sie bewirkt ein scharfkantiges Ausbrechen der obersten Schichten.
3. Eine stärkere chemische Beanspruchung führt zu mehr abgerundeten Korrosionen.

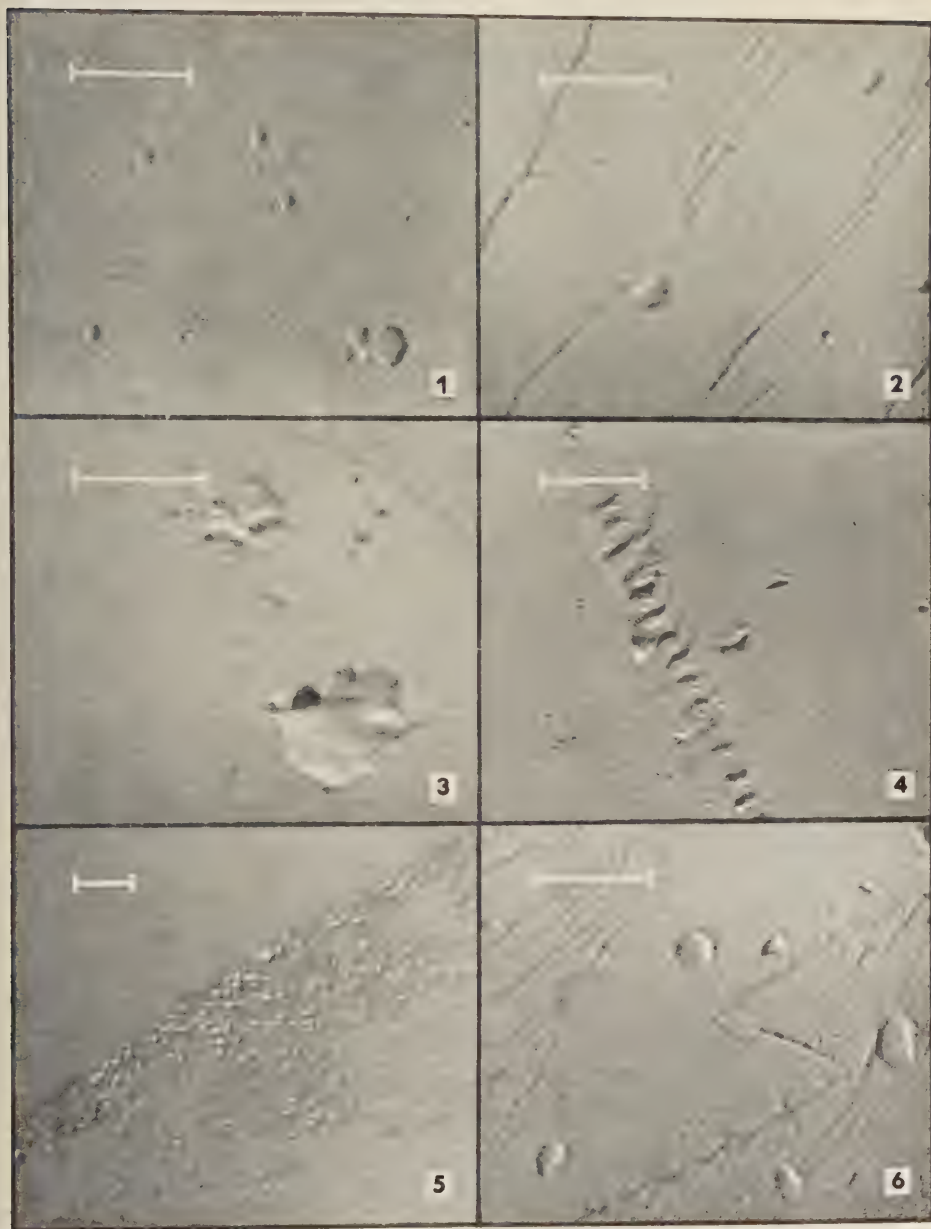
4. Neutrale Spülmittel bewirken ebenso wie reines Wasser auch bei wiederholter Anwendung keine sichtbaren Veränderungen.

Dieser Befund wurde auch an Porzellantassen mit Golddekor bestätigt.

5. Rückstände des Spülmittels sind auf den Oberflächen normalerweise nicht zu beobachten.

Für die Förderung dieser Arbeit durch wiederholte Diskussionen und zahlreiche Ratschläge möchten wir Herrn Professor Dr. B. v. BORRIES unseren besten Dank aussprechen. Wir danken auch Herrn Dr. S. MENNENÖH, der vor seinem Ausscheiden aus dem Rhein.-Westf. Institut für Übermikroskopie einen Teil der Arbeiten durchgeführt und einige der in diesem Aufsatz verwendeten Bilder aufgenommen hat.

[Eingegangen am 13. November 1953]

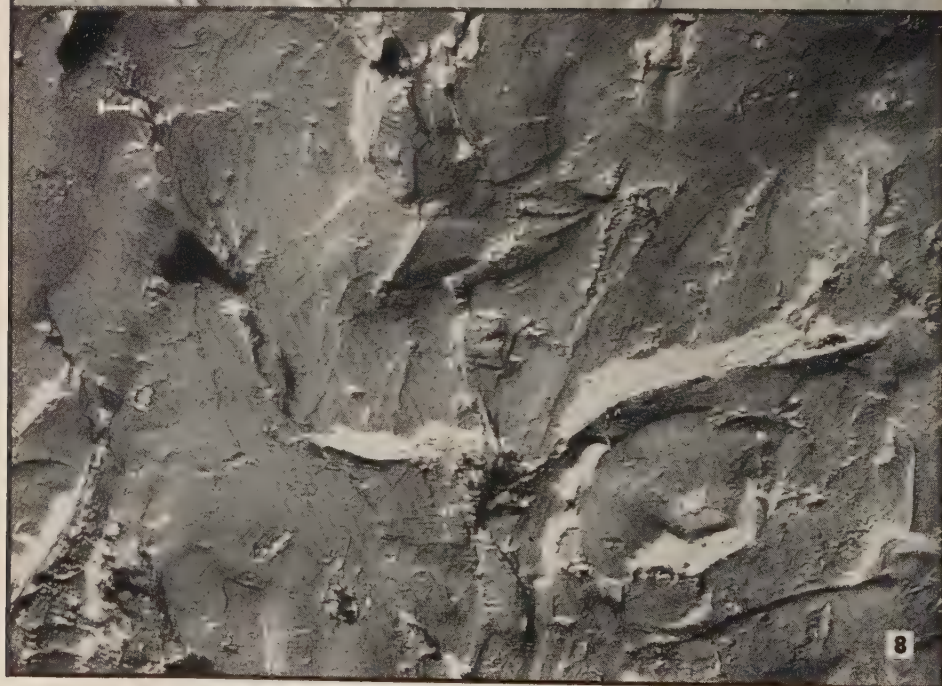
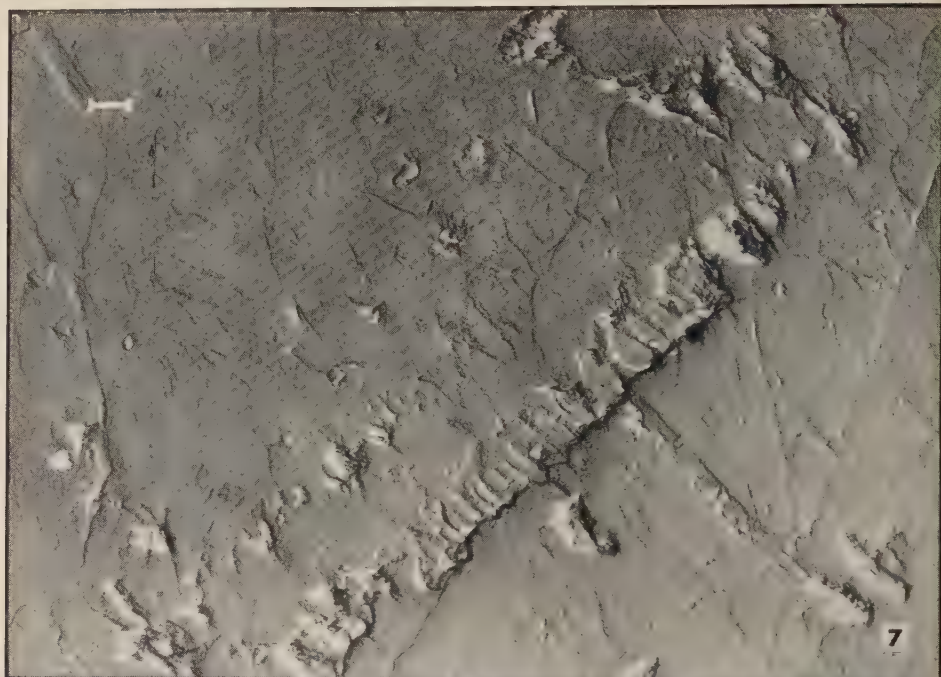


Tafel 1: Abb. 1: 6339/50; 15600:1 — Abb. 2: 6164/50; 16400:1

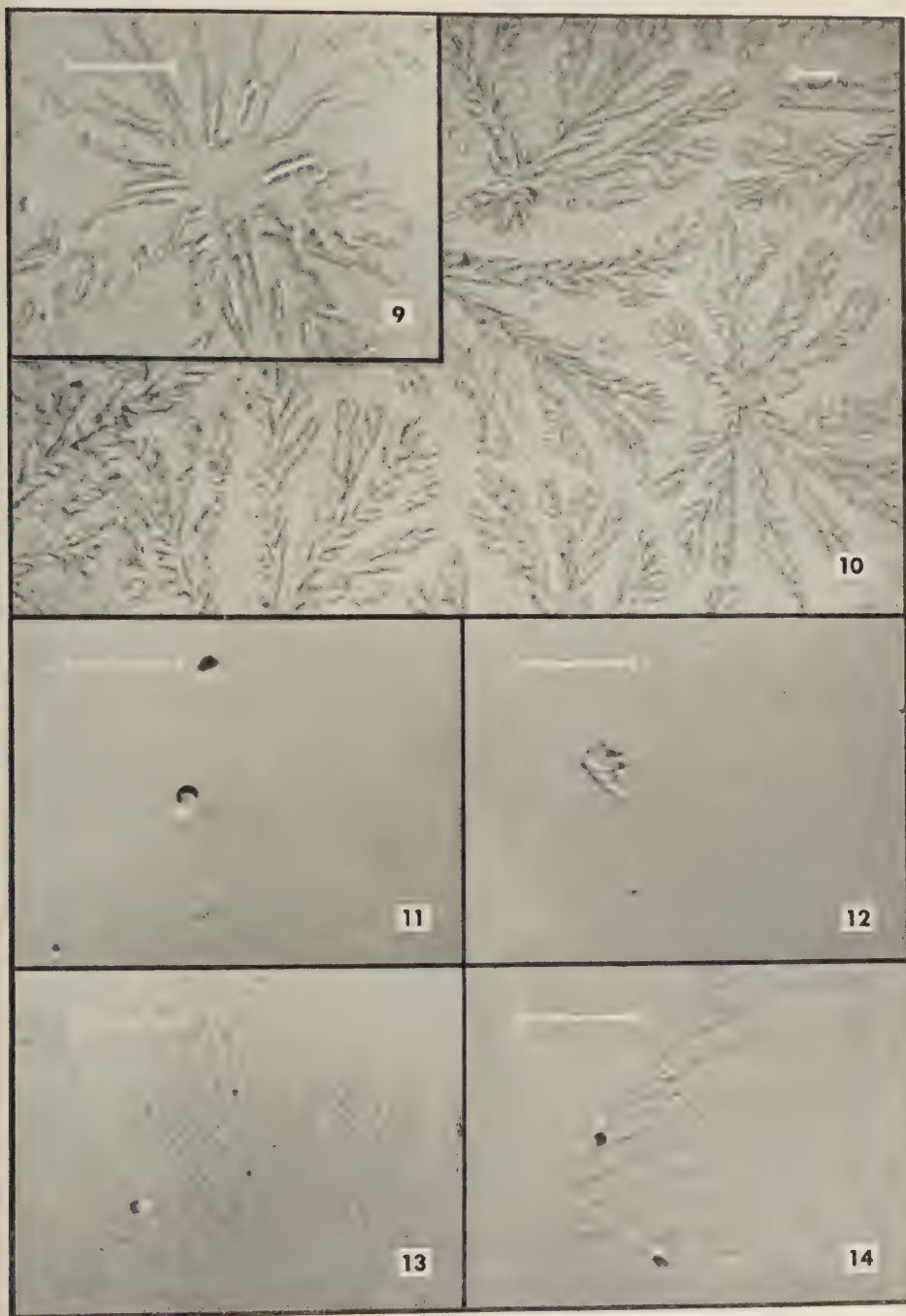
Abb. 3: 6250/50; 16800:1 — Abb. 4: 6041/50; 13400:1

Abb. 5: 4961/50; 7500:1 — Abb. 6: 6313/50; 17600:1

Ungebrauchte Porzellanteller, verschiedene Rauigkeiten der Oberfläche.

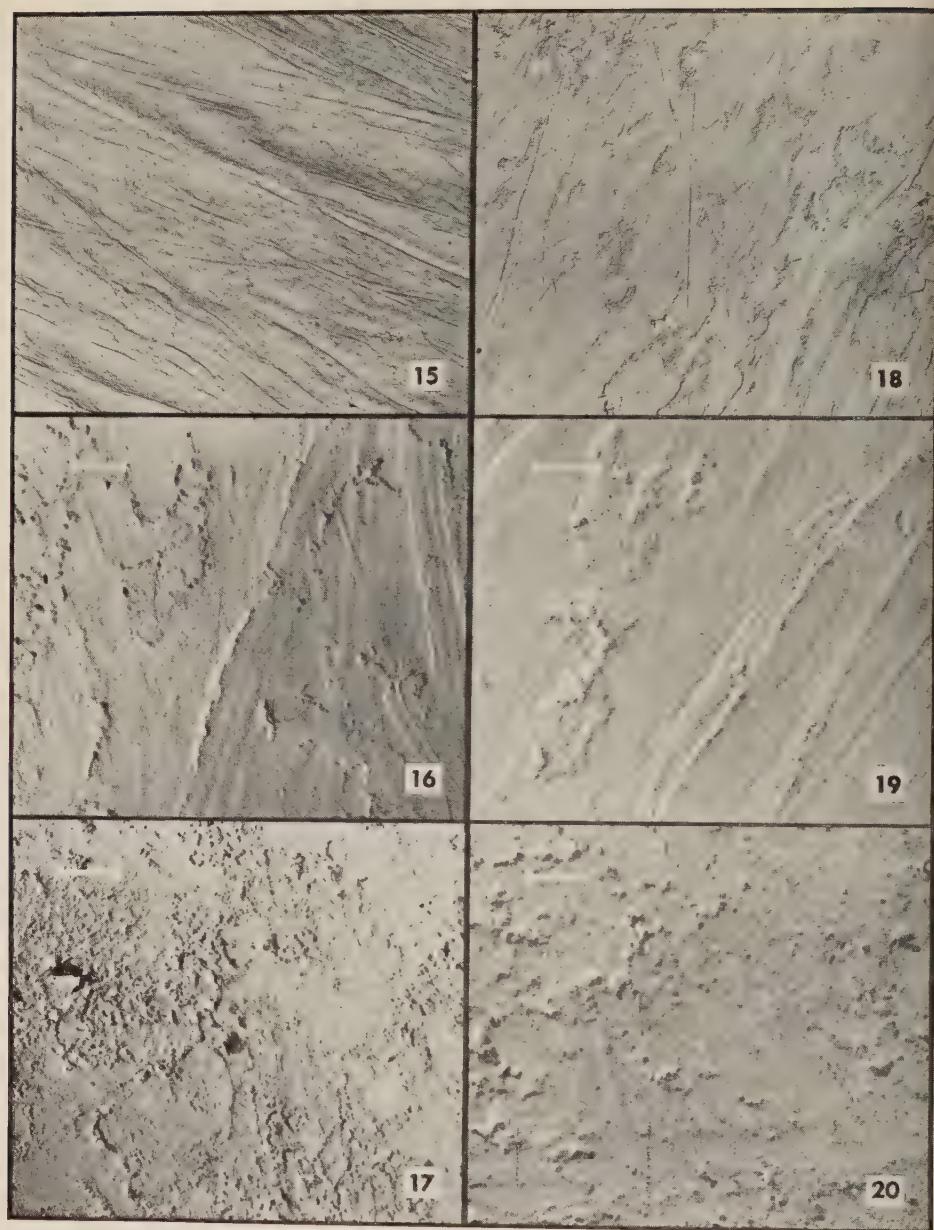


Tafel 2: Abb. 7: 4962/50; 5000 : 1 — Abb. 8: 4964/50; 5000 : 1
Gebrauchte Porzellanteller, durch mechanische Beanspruchung hervorgerufene Rauigkeiten
der Oberfläche.



Tafel 3: Abb. 9: 1352/51; 14000:1 — Abb. 10: 1276/51; 5000:1
 Abb. 11: 1604/51; 15300:1 — Abb. 12: 1611/51; 15700:1
 Abb. 13: 1625/51; 14900:1 — Abb. 14: 2077/51; 15300:1

Abb. 9 und 10 Porzellanoberfläche nach alkalischem Kochen, Abb. 11 bis 14 Porzellanoberfläche nach fünfzigmaligem Spülen mit Pril

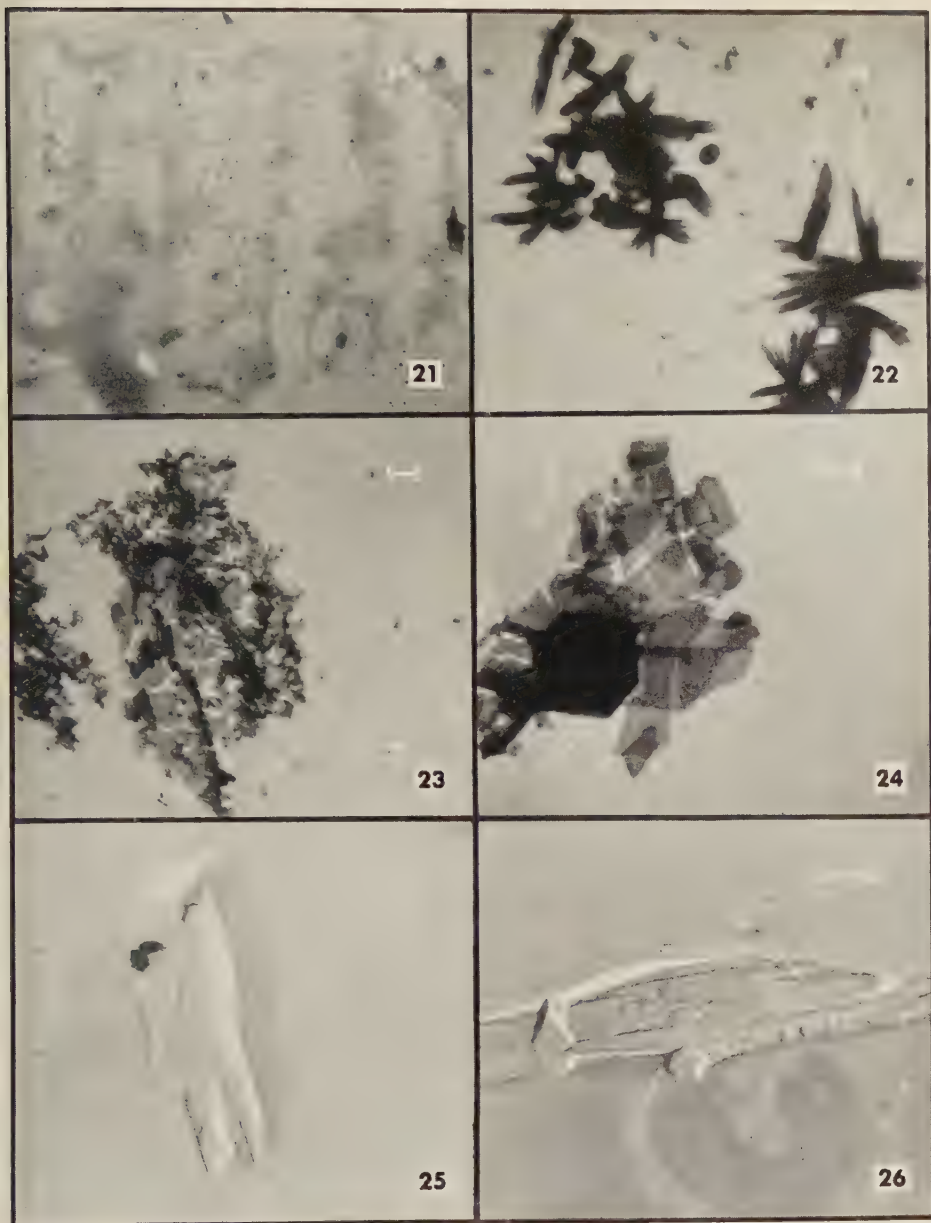


Tafel 4: Abb. 15: 5123/52; 1400 : 1 — Abb. 16: 5118/52; 7400 : 1

Abb. 17: 5101/52; 7900 : 1 — Abb. 18: 6619/52; 1300 : 1

Abb. 19: 6626/52; 7700 : 1 — Abb. 20: 6606/52; 7700 : 1

Oberfläche von Porzellan mit Golddekor, Abb. 15 bis 17 ungebraucht, Abb. 18 bis 20 nach fünfzigmaligem Spülen mit Pril



Tafel 5: Abb. 21: 6209/51; 2200 : 1 — Abb. 22: 6200/51; 2200 : 1

Abb. 23: 6667/51; 2500 : 1 — Abb. 24: 6667/51; 6600 : 1

Abb. 25: 6798/51; 6600 : 1 — Abb. 26: 6807/51; 6600 : 1

Abb. 21 bis 24 Auftrocknungen von Spülbädern auf SiO-Objektträgerfilmen, Abb. 25 bis 26 Oberflächen von Glasplatten mit aufgetrockneten Spülbadrückständen

Schrifttum der Elektronenmikroskopie

(6. Folge)

Herausgegeben von **B. v. Borries** und **H. Ruska**

K. Ergebnisse aus Biologie und Medizin

K 1. Allgemeines und Übersichten

1992. *Anderson, T. F.*: Electron micrographs of further biologic specimens. *J. Bacteriol.* 41, 260 (1941).
1993. *Levaditi, C., Lépine, P., und Verge, J.*: Les ultravirus des maladies animales. Libraire Maloine, Paris 1943, S. 1226.
1991. *Bravo, R. A.*: Biological problems before the supermicroscope. *Ion* 4, 173—181 (1944).
1995. *Mezerik, A. G.*: Electronics in medicine. *Hygeia* 22, 16 (1944).
1996. *Morton, G. A.*: Research accomplishments in biology. *Med. Physics* 396 bis 403 (1944).
1997. *Weiss, L. J.*: Application of the electron microscope to biological research. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 53, 53 (1944).
1998. *Donovan, G. E.*: A survey of the applications of electronics in medicine. *Brit. med. Bull.* 3, 137 (1945).
1999. *Lépine, P.*: Françaisches Elektronenmikroskop, erste Anwendungen auf biologischem Gebiet. *Bull. Acad. Méd. (Paris)* 129, 653—655 (1945).
2000. *Fauré-Frémiet, E.*: Application du microscope électronique à l'étude des problèmes de la biologie cellulaire et bactérienne. *L'Optique Electronique*, Ed. L. de Broglie, Editions de la Revue d'Optique Théorique et Instrumentale, Paris, S. 55—84 (1946).
2001. *Lépine, P.*: Erste biologische Bilder, die mit einem Elektronenmikroskop französischer Bauart erhalten wurden. *Ann. Inst. Pasteur* 72, 656—657 (1946).
2002. *Piekarski, G.*: Das Elektronenmikroskop in Biologie und Medizin. Naturforschung und Medizin in Deutschland. Ausgabe: Fiat Review of German Science 22, 173—209 (1946—1949) Teil II. Biophysics.
2003. *Sen, A. N.*: The electron microscope and its use in biology. *Indian Med. Gaz.* 81, 247—250 (1946).
2004. *Cosslett, V. E.*: The electron microscope and biological research. *New Biology* No. 3, 104 (1947).
2005. *Signer, R., und Studer, H.*: Investigations of biological structures with the electron microscope. *Chimia* 1, 136 (1947).
2006. *Wright, A. D.*: Modern surgery and the application of recent physical discoveries to medical diagnosis and treatment. *J. Roy. Soc. Arts* 95, 787 (1947).
2007. *Berta, L.*: Die Elektronenmikroskopie in der Mikrobiologie. *Orvosok Lapja Népegészségügy, Budapest* 2, 977—982 (1948).
2008. *Hall, C. E.*: Symposium. Teaching of electron microscopy. The teaching of electron microscopy and its role as a research method in biology. *J. appl. Phys.* 19, 119 (1948).
2009. *Bonifas, V., und Gallard, G.*: Anwendung der Elektronenmikroskopie für biologische Untersuchung. *J. de Radiologie et d'Electrologie* 30, 286 (1949).
2010. *Randall, J. T.*: Physical approach to the study of biological systems. *Nature* 164, 521—522 (1949).
2011. *Schmitt, F. O.*: Some commentaries on electron microscopy as applied in biology. *Fed. Proc.* 8, 530—535 (1949).
2012. *Grégoire, C.*: Microscope électronique et recherche biologique. *Médecine et Biologie*, Masson & Cie. Paris 1950.
2013. *Jung, F.*: Über die Bedeutung der Elektronenmikroskopie für Medizin und Biologie. *Elektrotechnik* 4, 416 bis 421 (1950).
2014. *Mudd, S.*: Electron microscopy in relation to the medical sciences. *Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949*, S. 113—116 (1950).
2015. *Pischinger, A.*: Über die Verwendungsmöglichkeit des Elektronenmikroskops in der zyto- und histologischen Forschung. *Mikroskopie* 5, 287—289 (1950).

2016. Wyckoff, R. W. G.: Biophysics. Science 113, No. 2924 (1951).
2017. Graul, E. H.: Über den gegenwärtigen Stand der strahlenbiologischen Forschung und deren allgemeine, biologische und medizinische Bedeutung. Der Hautarzt 2, 193—201 (1951).
2018. Ornstein, L., und Pollister, A. W.: Applications of phase microscopy in cytology and electron micrography. Trans. N. Y. Acad. Sci. 14, 194—199 (1952).
2019. Weber, R. L.: College courses in electron microscopy. Amer. J. of Physics 20, 301—304 (1952).
- K 2. Organische Makromoleküle**
2020. Clark, G. L., und Lawrie, J. W.: The electron micrographic measurement of molecules of beer proteins. Wallenstein Lab. Comm. 7, 79 (1944).
2021. Neurath, H., und Greenstein, J. P.: The chemistry of the protein and amino acids. Amer. Theo. Biochem. 13, 117 (1944).
2022. Waugh, D. F.: The linkage of corpuscular protein molecules. I. A fibrous modification of insulin. J. Amer. Chem. Soc. 66, 663 (1944).
2023. Waugh, D. F.: A fibrous modification of insulin. I. The heat precipitate of insulin. J. Amer. Chem. Soc. 68, 247 bis 250 (1946).
2024. Astbury, W. T.: X-ray and electron microscope studies and their cytological significance of the recently-discovered muscle proteins, tropomyosin and actin. Proc. of the 6th International Congress of Experimental Cytology, Stockholm 1947, 234—246 (1947) und Nature 160, 388 (1947).
2025. Hauser, E. A., und Le Beau, D. S.: Morphology of Lyogels. J. Phys. Coll. Chem. 51, 278—285 (1947).
2026. Spearman, J. B.: Structure of the Keratin molecule. Nature 159, 338 (1947).
2027. Benson, S. W., und Ellis, D. A.: Surface areas of proteins. I. Surface areas and heats of absorption. J. Amer. Chem. Soc. 70, 3563—3569 (1948).
2028. Feuer, G., Molnar, F., Petko, E., und Straub, F. B.: Studies on the composition and polymerization of actin. Hung. Acta Physiol. 1, 150 (1948).
2029. Fisher, R. B.: Precipitation phenomena as revealed by the electron microscope J. appl. Phys. 19, 123 (1948).
2030. Karush, F., und Siegel, B. M.: The structure of antigen films and long-range forces. Science 108, 107—108 (1948).
2031. Baker, W. O.: Murogel, a new macromolecule. Ing. Eng. Chem. 41, 511 (1949).
2032. Hall, C. F.: Electron microscopy of crystalline edestin. J. Biol. Chem. 179, 857—864 (1949).
2033. Ibell, J.: Antigen films and long range forces. Science 109, 18 (1949).
2034. Blout, E. R., und Doty, P. M.: Protein und nucleic acid conference. Science 112, 639—643 (1950).
2035. Hsiao, C. C., und Sauer, J. A.: On crazing of linear high polymers. J. appl. Phys. 21, 1071—1083 (1950).
2036. Oka, S.: Electron microscopic observations on macromolecules and viruses. J. Electr. Microscope Japan 1, 71—77 (1950).
2037. Reis, T.: The structure of coronene and its modification during the observation in the electron microscope. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 183—185 (1950).
2038. Revell, R. S. M., und Agar, A. W.: Studies of haemoglobin molecules with the electron microscope. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 138—140 (1950).
2039. Siegel, B. M., Johnson, D. J., und Mark, H.: Molecular weight investigations of high polymers with the electron microscope. J. Polymer. Sci. 5, 111—120 (1950).
2040. Beyley, S. T.: An electron microscope study of nucleic acid. Nature 168, 470 (1951).
2041. Blois, M. S. jr.: An approach to the microscopy of molecules. Science 114, 175—177 (1951).
2042. Bretschneider, L. H.: Die elektronenoptische Feinstruktur von organischen Kolloiden und dem Grundcytoplasma. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser. C., 54, 89—101 (1951).
2043. Dawson, I. M.: Electron microscopy of β -Lactoglobulin crystals. Nature 168, 241—242 (1951).
2044. Moos, W. S.: Electron microscopy of fibers obtained from reactions between copper and a fraction of pyocyanine. J. Bacteriol. 62, 767—770 (1951).
2045. Morgan, C., und Mowry, R. W.: Demonstration of Glykogen in the human liver by the electron microscope. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 76, 850—852 (1951).
2046. Steiner, R. F.: The reversible depolymerization of fibrin. Science 114, 460 (1951).
2047. Wyckoff, R. W. G.: Visualizing macromolecules and viruses. Amer. Scientist 39, 561—576 (1951).

2048. *Farrent, J. L., und Mercer, E. H.*: Electron microscopical observations of fibrous insulin. *Biochim. et Biophys. Acta* 8, 355—359 (1952).
 2049. *Frey-Wyssling, A.*: Feinbau der Membran gequollener Stärkekörner. *Experientia* 8, 101—103 (1952).
 2050. *Gard, S., Heller, L., und Mamros, H.*: Electron microscopy of euglobulin from a case of hyperglobulinemia. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 79, 328—330 (1952).
 2051. *Hodge, A. J.*: A new type of periodic structure obtained by reconstitution of paramyosin from acid solutions. *Proc. Nat. Acad. Sciences* 38, 850 bis 855 (1952).
 2052. *Hoster, M. S., von Winkle, Rabatin, J. D., und Hoster, A.*: Macromolecular particles obtained from human neoplastic and non — neoplastic lymph nodes. 2. Electron microscope study. *Cancer Res.* 12, 69—74 (1952).
 2053. *Keller, A.*: Morphology of recrystallizing polymers. *Nature* 169, 913—914 (1952).
 2054. *Rybak, B., und Bricka, M.*: Clichés électroniques de structures protéiques hétéropolaires provenant de sols doués de biréfringence d'écoulement. *Experientia* 8, 265—266 (1952).
 2055. *Wyckoff, R. W. G.*: The electron microscopy of macromolecules. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. VI, Academic Press Inc., New York (keine Jahresangabe).
- K 3. Virus und Bakterien einschließlich Spirochäten und Leptospiren**
2056. *Stanley, W. M.*: The biochemistry of viruses. *Amer. Rev. Biochem.* 9, 545 (1940).
 2057. *Stanley, W. M.*: Some chemical, medical and philosophical aspects of viruses. *Science* 93, 143 (1941).
 2058. *Cohen, S. S., und Stanley, W. M.*: The molecular size and shape of the nucleic acid of tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.* 144, 589 (1942).
 2059. *Knight, C. A., und Lauffer, M. A.*: A comparison of the alkaline cleavage products of two strains of tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.* 144, 411 (1942).
 2060. *Markham, R., Smith, K. M., und Lea, D. E.*: The sizes of viruses and the methods employed in their estimation. *Parasitology* 34, 315 (1942).
 2061. *Luria, S. E.*: Electron microscopic studies of bacteriophage. *J. Bacteriol.* 45, 73 (1943).
 2062. *Stanley, W. M.*: Chemical structure and the mutation of viruses. *Cornell Univ. Press, Ithaca, New York* 1943.
 2063. *Butenandt, A.*: Die moderne Virusforschung und ihre Bedeutung für Chemie, Biologie und Medizin. *Dtsch. med. Wschr.* 70, 379 (1944).
 2064. *Gard, S.*: The morphology of poliomyelitis virus. *Sven. Läkartidningen*, No. 36 (1944).
 2065. *Gard, S., Snellman, O., und Tyren, H.*: Studies on macromolecular components in faeces and intestinal contents. *The Swedberg, 1884—1944, Almerist and Wiksells, Uppsala* 1945, 530—539 (1944).
 2066. *Goldsmith, N. R.*: Bacteriophage electron micrographs. *J. Amer. Med. Assoc* 126, 914 (1944).
 2067. *Hoagland, C. L.*: The chemistry of viruses. *Ann. Rev. Biochem.* 12, 615 bis 638 (1944).
 2068. *Lauffer, M. A., und Stanley, W. M.*: The colloid chemistry of purified viruses. *Colloid Chemistry Rheinhold N. Y.* 5, Ch. 36, 785—807 (1944).
 2069. *Lauffer, M. A., und Miller, G. L.*: The sedimentation rate of the biological activities of influenza A virus. *J. exper. Med.* 80, 525—533 (1944).
 2070. *Miller, G. L.*: Influence of pH and of certain other conditions on the stability of the infectivity and red cell agglutinating activity of influenza virus. *J. exper. Med.* 80, 511—524 (1944).
 2071. *Miller, G. L., Lauffer, M. A., und Stanley, W. M.*: Electrophoretic studies on PR 8 influenza virus. *J. exper. Med.* 80, 553—563 (1944).
 2072. *Mudd, S.*: Relationship of virus to immunity as shown by electron microscope. *J. Amer. Med. Assoc.* 126, 636 bis 639 (1944).
 2073. *Wilson, D. C.*: Recent advances in the study of virus diseases. *Can. J. Med. Tech.* 6, 159 (1944).
 2074. *Anderson, T. F.*: The activity of a bacteriostatic substance in the reaction between bacterial virus and host. *Science* 101, 565—566 (1945).
 2075. *Babudieri, B., und Biethi, S. B.*: Electron microscopic observations on bacteriolysis produced by lysozyme of tears. *Arch. Ophthalm.* 33, 449 (1945).
 2076. *Delbruck, M.*: The burst size distribution in the growth of bacterial viruses (bacteriophages). *J. Bacteriol.* 50, 131 (1945).
 2077. *Delbruck, M.*: Effects of specific antisera on the growth of bacterial viruses (bacteriophages). *J. Bacteriol.* 50, 136 (1945).
 2078. *Donowick, R., und Wyckoff, R. W. G.*: Tests of epidemic typhus vaccines

- U. S. Public Health Services Pub Health Repts. 60, 560 (1945).
2079. *Donowick, R., und Wyckoff, R. W. G.*: The comparative potencies of several typhus vaccines. U. S. Public Health Service, Pub Health Repts. 60, 605 (1945).
2080. *Gratia, A.*: The electron microscope in the study of bacteriophage. Bull. Acad. Roy. Med. Belg. 10, 139—150 (1945).
2081. *Knight, C. A.*: A sedimentable component of allantoic fluid and its relationship to influenza virus. J. exper. Med. 80, 83 (1945).
2082. *McCarty, M.*: Reversible inactivation of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. exper. Med. 81, 501—514 (1945).
2083. *McLean, I. W. Jr., Beard, D., Taylor, A. R., Sharp, D. G., und Beard, J. W.*: The antibody response of swine to vaccination with inactivated swine influenza virus. Nature 101, 544—546 (1945).
2084. *Schultz, E. W., und Thomassen, P. R.*: Electron microscope observation on certain bacteria and bacteriophages. J. Bacteriol. 50, 236 (1945).
2085. *Sharp, D. G., und Taylor, A. R.*: The electron microscope — an exposition of its operation and application to the study of viruses and other disease agents. Merck Rept. 54, 4—8 (1945).
2086. *Smith, K. M.*: Plant viruses. Endeavour 4, 22 (1945).
2087. *Stanley, W. M.*: The preparation and properties of influenza virus vaccines concentrated and purified by differential centrifugation. J. exper. Med. 81, 193—218 (1945).
2088. *Taraskevich, L. M.*: On the morphology of the polyhedra of mulberry silkworm jaundice. Microbiol. 14, 202 (1945).
2089. *Williams, R. C., und Wyckoff, R. W. G.*: Electron shadow micrography of the tobacco virus protein. Science 101, 594—596 (1945).
2090. *Anonym*: Electron micrographs of viruses. Amer. Med. Ass. 131, 1062 (1946).
2091. *Bang, F. B.*: Studies on Newcastle disease virus. III. Characters of the virus itself with particular reference to electron microscopy. J. exper. Med. 88, 251—266 (1946).
2092. *Cohen, S. S., und Anderson, T. F.*: Chemical studies on host-virus interactions. J. exper. Med. 84, 511 (1946).
2093. *Crook, E. M. und Sheffield, F. M. L.*: Electron microscopy of viruses; I. State of aggregation of tobacco mosaic virus. Brit. J. exper. Pathol. 27, 328 (1946).
2094. *Foster, R., und Antes, A. C.*: A comparison of electron micrographs with photomicrographs of young bacterial cultures stained to demonstrate desoxyribose-nucleic acid. J. Bacteriol. 51, 584 (1946).
2095. *Giuntini, J., Lépine, P., Nicolle, P., und Croissant, O.*: Elektronenbilder einiger Bakteriophagen und die Untersuchung ihrer Gestalt. Société de Microbiologie 5, 12 (1946).
2096. *Knight, C. A.*: The preparation of highly purified PR 8 influenza virus from infected mouse lungs. J. exper. Med. 83, 11 (1946).
2097. *Lauffer, M. A.*: Contribution of virus research to chemistry and physics. Chem. Eng. News 24, 2896 (1946).
2098. *Lépine, P., Giuntini, J., Croissant, O., und Nicolle, P.*: Anwendung des Bedampfungsverfahrens bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Bakteriophagen. Soc. française Microbiol. 5, 12 (1946).
2099. *Oster, G.*: Molecular weights and other properties of viruses as determined by light absorption. Science 103, 306 (1946).
2100. *Pirie, N. W.*: The viruses. Ann. Rev. Biochem. 15, 573—592 (1946).
2101. *Price, W. C.*: Purification and crystallization of southern bean mosaic virus. Amer. J. Bot. 33 (I) 45 (1946).
2102. *Shechter, A. B.*: Preliminary studies in the electron microscope of some plant virus inclusion bodies. J. Roy. Micr. Soc. 66, 69 (1946).
2103. *Weiser, R. S., und Hargiss, C. O.*: Studies on the death of bacteria at low temperatures. J. Bacteriol. 52, 71 bis 79 (1946).
2104. *Anonym*: Isolation of polio virus. Arch. Phys. Med. 28, 115—116 (1947).
2105. *Bawden, F. C., und Crook, E. M.*: Some properties of potato virus X in leaf extract made in different ways. Brit. J. exper. Pathol. 28, 403 (1947).
2106. *Boivin, A.*: Directed mutation in colon bacilli, by an inducing principle of desoxyribonucleic nature: its meaning for the general biochemistry of heredity. Cold Spring Harbor Symposia of quantitative Biology 12, 7—17 (1947).
2107. *Coblentz, J. M., und Levine, M.*: The effect of metabolites of *E. coli* on the growth of coli-aerogenes bacteria. J. Bacteriol. 53, 455 (1947).
2108. *Coffey, J. M., und Cohen, S. M.*: A study of hemophilus pertussis by means of the electron microscope. J. Bacteriol. 54, 275 (1947).

2109. *Dyar, M. T.*: Isolation and cytological study of a free-living spirochete. *J. Bacteriol.* 54, 483 (1947).
2110. *Elford, W. J., Smiles, J., Chu, C. M., und Dudgeon, J. A.*: Electron micrographs of *Staphylococcus bacteriophage „K“* and the viruses of vaccinia and Newcastle disease. *Biochem. J.* 41, 25 (1947).
2111. *Evans, C. A. und Underdahl, N. R.*: Spore wall demonstrated with the electron microscope. *J. Bacteriol.* 53, 647 bis 648 (1947).
2112. *Gallardo, E.*: Bestimmung, charakteristische Merkmale und Identifizierung von Viren. *Rev. Sanidad Higien. Publ. Madrid* 21, 557—593 (1947).
2113. *Gard, S., und Magun, P. v.*: Studies on interference in experimental influenza. II. Purification and centrifugation experiments. *Arkiv. Kemi. Mineral. Geol.* 24, 1—4 (1947).
2114. *Graff, S., Moore, D. H., Stanley, W. M., Randali, H. T., und Hoagensen, C. D.*: The milk agent. Program of the fourth International Cancer Research Congress, St. Louis, September 1947, 144.
2116. *Holzer, W.*: Die Wirkung von Penicillin nach licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchung. *Wiener Z. Innere med. Grenzgeb.* 28, 333—352 (1947).
2117. *Knight, C. A.*: Nucleoproteins and virus activity. *Symposia on Quantitative Biology* 12, 115—121 (1947).
2118. *Malkiel, S., und Stanley*: Immunochemical studies on tobacco mosaic virus. I. Their action with homologous rabbit antiserum. *J. Immunol. Virus Res. exper. Chemother.* 57, 31 (1947).
2119. *Markham, R.*: The nature of viruses and the irradiation of plant viruses. Supplement No. I of the *Brit. J. of Radiology* 16, (1947).
2120. *Lofgren, R.*: Electron microscopy as applied to some bacteriological problems. *J. Bacteriol.* 54, 271 (1947).
2121. *Penso, G., und Scanga, F.*: Untersuchungen über die Wirkungsweise von Streptomycin. I. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Esch. coli*, die während der Wachstumsphase mit Streptomycin behandelt wurden. II. Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Wirkungsweise von Streptomycin auf resistente *Esch. coli*. *Rend. Ist. Super. Sanita Rom* 10, 633—638 (1947).
2122. *Rhodes, H. E. und Hardenbroek, H. Jr.*: The occurrence of vibronic absorption in an Illinois dairy herd. *Cornell Vet.* 37, 8 (1947).
2123. *Van Thiel, P. H., und van Iterson, W.*: An electron microscopical study of *Leptospira biflexa*. *Proc. Kon. Ned. Akad. van Wetensch.* 50, 976 (1947).
2124. *Topping, N. H., und Atlas, L. T.*: The common cold. A note regarding isolation of an agent. *Science* 106, 636 (1947).
2125. *Wirth, J., Athanasiu, P., Barski, G., und Croissant, O.*: Etude au microscope électronique d'inclusions protoplasmiques dans des cellules rénales en cultures pures infectées avec du virus vaccinal. *C. R. Acad. Sci. Paris* 225, 827 (1947).
2126. *Woodruff, H. B., Nunheimer, T. O. und Lee, S. B.*: A bacterial virus for actinomyces. *Grisens. J. Bacteriol.* 54, 535 bis 541 (1947).
2127. *Bailey, C. A., Dierk, F. H., und Proffit, J. E.*: On the purification of the *Rickettsia* of tontsugamushi disease. *Federation Proc.* 7, 301 (1948).
2128. *Brieger, E. M., und Cosslett, V. E.*: Electron microscopy of *Mycobacteria tuberculosis*. *J. appl. Phys.* 19, 1188 (1948).
2129. *Markham, R., Matthews, R. E. F., und Smith, K. M.*: Specific crystalline protein and nucleoprotein from a plant virus having insect vectors. *Nature* 162, 88 (1948).
2130. *Martin, H.*: Electrokinetic change in human erythrocytes during adsorption and elution of PRS influenza virus. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 68, 385 bis 392 (1948).
2131. *Polson, A.*: New amino-acids in bacterial hydrolysates. *Nature* 161, 351 bis 353 (1948).
2132. *Robinow, C. F., und Cosslett, V. E.*: Nuclei and other structures of bacteria. *J. appl. Phys.* 19, 124 (1948).
2133. *Smith, K. M.*: Plant virus research at Cambridge. *Nature* 161, 776 (1948).
2134. *Stanley, W. M.*: Achievement and promise in virus research. *Amer. Scientist* 36, 59 (1948).
2135. *Steere, R. L., und Williams, R. C.*: A simplified method of purifying tomato bushy-stunt virus for electron microscopy. *Phytopathology* 38, 948 (1948).
2136. *Takahashi, W. N.*: An electron microscope study of tobacco mosaic virus extracted from pulp and juice after various periods of infection. *Phytopathology* 38, 279 (1948).
2137. *Takahashi, W. N.*: Crystallization of squash mosaic virus. *Amer. J. Botany* 35, 243 (1948).

2138. *Werner, G. H., und Kellenberger, E.*: The role of the electron microscope in the study of the mode of action of antibiotics. *Bull. Acad. Suisse Sci. Med.* 4, 263—274 (1948).
2139. *Wood, W. B. Jr., und Smith, M. R.*: The inhibition of surface phagocytosis by the capsular „slime layer“ of *Pneumococcus* Type III. *J. exper. Med.* 90, 85—98 (1948).
2140. *Wyckoff, R. W. G.*: Electron microscopic study of viruses. *J. Amer. Med. Association* 136, 1081—1083 (1948).
2141. *Wyckoff, R. W. G.*: The electron microscopy of microorganisms. *Proc. 4. International Congresses on Tropical Med. and Malaria*, Washington, D. C., 10. bis 18. Mai 1948.
2142. *Bang, F. B.*: Formation of filamentous forms of Newcastle disease virus in hypertonic concentration of sodium chloride. *Proc. Soc. exper. Biol. N. Y.* 71, 50—52 (1949).
2143. *Bang, F. G., und Gey, G. O.*: Electron microscopy of tissue cultures infected with the virus of Eastern Equine Encephalomyelitis. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 71, 78 (1949).
2144. *Bartholomew, J. W.*: Flagellation of certain species of *Pseudomonas* as seen with the electron microscope. *J. Gen. Microbiol.* London 3, 340 (1949).
2145. *Bergold, G.*: Virus research. *Biochemistry* 2, 39—81 (1949).
2146. *Bernard, R., Gibard, H., Hirtz, J., Mackowiak, C. und Lorrin, R.*: Observation du virus de la fièvre aphteuse au microscope électronique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 229, 1272—1274 (1949).
2147. *Brodie, J., und Shepherd, W.*: Further observations on the differential inhibition of coliform bacilli and rough variants of intestinal pathogens. *J. gen. Microbiol.* 3, 74 (1949).
2148. *Kerby, G. P., und Mitarbeiter*: Purification, pH-stability, and sedimentation properties of the T₇ bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 63, 93 bis 107 (1949).
2149. *Knaysi, G., und Hillier, J.*: Preliminary observations on the germination of the endospore in *Bacillus megatherium* and the structure of the spore coat. *J. Bacteriol.* 57, 23 (1949).
2150. *Lanni, F., und Mitarbeiter*: The egg-white inhibitor of influenza, virus haemagglutination. *J. biol. Chem.* 179, 1275 (1949).
2151. *Palacios-De-Borao, G. S. J.*: Electron microscopy of symbiotic nitrogen bacteria. *Microbiologia Española* 2, Madrid 1949.
2152. *Reagan, R. L., Lillie, M. G., Hauser, J. E., und Brueckner, A. L.*: Electron micrographs of the hamster-adapted Newcastle virus. *Cornell Vet.* 38, 418 bis 420 (1948).
2153. *Rhian, M., Lensen, S. G., und Williams, R. C.*: An electron microscope study of material from tissue of the central nervous system of poliomyelitic and normal mice and cotton rats. *J. Immunol.* 62, 487—504 (1949).
2154. *Ris, H., und Fox, J. P.*: The cytology of *Rickettsiae*. *J. exper. Med.* 89, 681 (1949).
2155. *De Robertis, E.*: An electron microscope study of nerves infected with the B-virus. *J. exper. Med.* 90, 291 (1949).
2156. *De Robertis, E., und Schmitt, F. O.*: An electron microscope study of nerves infected with human poliomyelitis virus. *J. exper. Med.* 90, 283 (1949).
2157. *Van Rooyen, C. E., und Scott, G. D.*: Electron microscopy of typhus *Rickettsiae*. *Canad. J. Res. (E)* 27, 250—253 (1949).
2158. *Ruziczka, O., und Orth, E.*: Elektronenoptisch dargestellte Streptomycin-Wirkung. *Wiener Med. Wochenschrift* 99, 413—414 (1949).
2159. *Ruziczka, O.*: Elektronenoptisch faßbare Wirkung der Antibiotika. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 99, 22 bis 24 (wahrscheinlich 1949).
2160. *Sharp, D. G., und Wolf, E. A.*: The virus of tobacco leaf-curl. *Phytopath.* 39, 225—230 (1949).
2161. *Sykes, J. A., und Reed, R.*: The control of the swarming of *Proteus vulgaris* by Boric acid. *J. gen. Microbiol.* 3, 117 (1949).
2162. *Takahashi, W. N.*: The effect of pH on the linear aggregation of tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 36, 642 bis 645 (1949).
2163. *Tchan, Y. T., und Guintini, J.*: Etude cytologique des bactéries en microscopie électronique. *Ann. Inst. Pasteur* 77, 185—188 und 188—192 (1949).
2164. *Thung, T. H.*: Anfangsgründe der Pflanzenvirologie. *Meded. Landbouwhogeschool* 49, 1—156 (1949).
2165. *Veltmann, G., und Woerber, K. H.*: Beitrag zur bakteriziden Wirkung des Ultraschalls. *Strahlentherapie* 79, 587 bis 598 (1949).
2166. *Angulo, J. J., Watson, J. H. L., und Olarte, J.*: Artefacts with other non-specific appearances resembling virus particles, and the so-called filamentous forms of influenza and fowl-pest viruses in human skin tissue fluid examined

- with the electron microscope. *J. Bacteriol.* 60, 129 (1950).
2167. *Barwell, C. F., Dawson, I. M., und McFarlane, A. S.*: Electron microscopy of murine psittacosis virus. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 123—126 (1950).
 2168. *Beard, D., Eckert, E. A., Csaky, T. Z., Sharp, D. G., und Beard, J. W.*: Particulate component of plasma from fowls with avian erythromyeloblastic leucosis. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 75, 533—536 (1950).
 2169. *Bergold, G. H.*: The multiplication of insect viruses as organisms. *Canad. J. Res. (E)* 28, 5—10 (1950).
 2170. *Coriell, L. L., Rake, G., Blank, H., und McNair Scott, T. F.*: Electron microscopy of herpes simplex. *J. Bacteriol.* 59, 61—68 (1950).
 2171. *Cosslett, V. E.*: Remarks on the crystalline structure of some plant viruses. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, 152—155 (1950).
 2172. *Cosslett, V. E., Miles, J. A. R., und Stoker, M. G. P.*: The morphology of mouse pneumonitis virus (Nigg) in various hosts. *Brit. J. exper. Pathol.* 31, 454 (1950).
 2173. *Dawson, I. M.*: Electron microscopy of influenza virus. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 120 bis 122 (1950).
 2174. *Eisenstark, E., McMahon, K. J., und Eisenstark, R.*: A cytological study of a pleomorphic strain of azotobacter with the electron and phase microscopes and the Robinow nuclear-staining technique. *J. Bacteriol.* 59, 75—81 (1950).
 2175. *Fullton, R. W.*: Bacteriophages attacking *Pseudomonas tabaci* and *B. angulatum*. *Phytopathology* 40, 936—949 (1950).
 2176. *Gey, G. O., und Bang, F. B.*: A study of the effect of the virus of eastern equine encephalomyelitis on normal and tumor cells in tissue culture and by electron microscopy. *Cancer Res.* 10, 219 (1950).
 2177. *Giuntini, J., und Tchan, Y. T.*: Etude de l'appareil nucléaire de quelques bactéries en microscopie électronique soumises à une digestion enzymatique par action de ribonuclease. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 159—162 (1950).
 2178. *Haardick, H.*: Das Virusproblem. *Die Kirche in der Welt* 3, 375—384 (1950).
 2179. *Hengel, R., Kausche, G. A., und Sheris, E.*: Über zwei dörflche Q-Fieberepidemien in Baden. *Dtsch. Med. Wochenschrift* 75, 1505—1507 (1950).
 2180. *Hercik, F.*: Idealistische Vorstellungen über die Natur der Bakteriophagen. *Biologicka listy* 31, 162—167 (1950).
 2181. *Hercik, F.*: Die Entwicklungsstadien des Bakteriophagen. *Lekarske listy* 5, 433—435 (1950).
 2182. *Hercik, F.*: Die Elektronenmikroskopie des Bakteriophagen. *Casopis lékařů českých* 89, 91 (1950).
 2183. *Hercik, F.*: Die Wirkung von ultraviolett Licht auf die Vermehrung der Bakteriophagen. *Biologické listy* 30, 169—173 (wahrscheinlich 1950).
 2184. *Hillier, J.*: Electron microscopy of microorganisms and viruses. *Annual Review of Microbiology* 1950.
 2185. *Howwink, A. L.*: Some observations on bacteria growing on surfaces. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 141—143 (1950).
 2186. *van Iterson, W.*: Some observations on bacterial flagellation. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 117—119 (1950).
 2187. *Janke, A.*: Zur Begeißelung der Bakterien. *Naturwiss. Rundschau* 3, 553 bis 558 (1950).
 2188. *Koerber, W. L., Greenspan, G., und Lang Lykke, A. F.*: Observations on the multiplication of phages affecting *streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 60, 29 (1950).
 2189. *Larsen, R. H., Matthews, R. E. F., und Walker, J. C.*: Relationships between certain viruses affecting the genus *Brassica*. *Phytopathology* 40, 955 bis 962 (1950).
 2190. *Leyon, H., und Gard, S.*: Electron microscopy of Theiler's virus, strain F. A. *Biochem. biophys. Acta* 4, 385 bis 390 (1950).
 2191. *Liebermeister, K.*: Zur Darstellung von nicht formbeständig eintrocknenden Mikroorganismen. *Optik* 7, 310 (1950).
 2192. *Locquin, M.*: Structure de la membrane des spores de myxomycetes. Proc. Conference Electron Microscopy Delft, Juli 1949, S. 150—151 (1950).
 2193. *Luria, S. E., und Human, M. L.*: Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 59, 551—560 (1950).
 2194. *McClung, N. M.*: Morphological studies in the genus *Nocardia*. II. Cytological studies. *J. Bacteriol.* 59, 589 (1950).
 2195. *Merling, K. B.*: A binocular magnifier for the electron microscope for critical viewing and focusing of finest structures (Bacteriophage of *B. coli*). *J. Roy. micr. Soc.* 70, 381 (1950).
 2196. *Oka, S.*: Electron microscopic observations on macromolecules and viruses.

- J. Electron Microscope Japan 1, 71 bis 77 (1950).
2197. Orth, E., und Ruziczka, O.: Untersuchungen am Elektronenmikroskop über die Chloromycetin-Wirkung. Wiener Medizin. Wochenschrift 100, 570 bis 571 (1950).
2198. Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.: Electron micrographs of Negri bodies found in rabies. J. inf. Dis. No. 3, 213 bis 216 (1950).
2199. Reagan, R. L., Schenk, D. M., und Brueckner, A. L.: Morphological observations of electron microscopy of the Brunhilde strain of poliomyelitis virus. J. Infect. Dis. 86, 295—300 (1950).
2200. Reagan, R. L., Lillie, M. G. Hickmann, J. W., und Brueckner, A. L.: Studies of the virus of equine infectious anemia. Amer. J. vet. Res. 11, 157—158 (1950).
2201. Ruziczka, O., und Orth, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Vermehrung der Tuberkelbazillen. Wiener Medizin. Wochenschr. 100, 572 (1950).
2202. Scanga, F.: Sull' azione in vitro dell' aureomicina su diversi ceppi di Brucella e di Salmonella. Rendiconti Istit. Sup. San. 13, 534—545 (1950).
2203. Strauss, M. J., Bunting, H., und Melnick, J. L.: Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. J. of Investigative Dermatology 15, 433 bis 443 (1950).
2204. Sugita, Y., und Sugita, S.: On the infective agents of trachoma and vaccinia: A special study by electron microscopy. Electron Microscope Japan 1, 95—97 (1950).
2205. Theismann, H., und Wallhäuser, K. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an beschalteten Bakterien. Die Naturwiss. 37, 185—186 (1950).
2206. Wyckoff, R. W. G.: Les bactériophages et les virus en microscopie électronique tels qu'ils apparaissent sur coupes minces de tissus contaminés. La Presse Médicale 58, 1439—1441 (1950).
2207. Angulo, J. J.: On the identity of the so-called filamentous forms of influenza and fowl pest viruses. Arch. ges. Virusforsch. 4, 199—206 (1951).
2208. Angulo, J., Watson, J. H. L., Wedderburn, C. C., Léon-Blanco, C., und Varela, G.: Electronmicrography of treponemas from cases of yaws, pinta, and the so-called cuban form of pinta. Amer. J. of Tropical Medicine 31, 458—478 (1951).
2209. Banfield, W. G., Bunting, H., Strauß, M. J., und Melnick, J. L.: Electron micrographs of thin sections of Molluscum Contagiosum. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 77, 843—847 (1951).
2210. Bang, F. B., Levy, E., und Gey, G. O.: Some observations on host-cell-virus relationships in fowl-pox. I. Growth in tissue culture. II. The inclusion produced by the virus on the chick chorioallantoic membrane. J. Immunol. 66, 329—346 (1951).
2211. Baudet, J., und Mitarbeiter: Variation of the size and of the size distribution of tobacco mosaic virus particles depending on the method of preparation. Discussions of the Faraday Society No. 11, 236—252 (1951).
2212. Bawden, F. C., und Nixon, H. L.: The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. J. General Microbiology 5, 104—109 (1951).
2213. Berna, J. D., und Carlisle, C. H.: The place of x-ray diffraction methods in the estimation of the size and mutual arrangements of colloidal particles. Discussions of the Faraday Society No. 11, 227—229 (1951).
2214. Brakke, M. K., Black, L. M., und Wyckoff, R. W. G.: The sedimentation rate of potato yellow-dwarf virus. Amer. J. Bot. 332—342 (1951).
2215. Bock, M., Gönnert, R., Grün, L., Kikuth, W., und Roemer, G. B.: Pleuropneumonieartige Mikroorganismen bei „Viruspneumonien“? Eine Stellungnahme zu der gleichnamigen Veröffentlichung von Gerhard Grünholz (Kli. Wo. 1950, 480). Kli. Wo. 29, 87—88 (1951).
2216. Brieger, E. M., Miles, J. A. R., Cosslett, V. E., und Horne, R. W.: Nature and infectivity of granulat forms of the bovine tubercle bacillus. Nature 168, 96—98 (1951).
2217. Bringmann, G.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die zytologische Natur der Granula von Corynebacterium diphtheriae. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 156, 493—502 (1951).
2218. Bringmann, G.: Elektronenmikroskopische Studien über die Kernäquivalente und die Zellorganisation von Bacillus polymyxa Prasmowski und anderen Bazillen. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 156, 547—556 (1951).
2219. Bringmann, G.: Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Studien zur Morphologie und Entwicklung von Streptomyces griseus Krainsky. Zbl. f. Bakt. Orig. 157, 349—355 (1951).
2220. Chapman, G., Hillier, J., und Johnson, F. H.: Observations on the bacteriophage of Erwinia Carotovora. J. Bacteriol. 61, 261—268 (1951).

2221. Cowan, P., und Crowfoot-Hodgkin, D.: A comparison of x-ray measurements of air-dried tobacco necrosis protein crystals with electron microscope data. *Acta cryst.* 4, 160—161 (1951).
2222. Gold, A. H., und Jensen, D. D.: An electron microscope study of cymbidium mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 38, 577—578 (1951).
2223. Grün, L., und Roëmer, G. B.: Elektronenoptische Untersuchungen über die Sporenbildung. *Arch. Hygiene und Bakteriologie* 135, 38—43 (1951).
2224. Das Gupta, N. N., und De, M. L.: Structure of Sannhemp (*Crotalaria juncea* Linn.) Mosaic virus with the electron microscope. *Nature* 168, 114 (1951).
2225. Hennessen, W.: Über die Lokalisation der Bakteriophagen. *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn.* 60, 172 bis 180 (1951).
2226. Hennessen, W., Grün, L., und Lindner, E.: Der Einfluß des zwischen Nährboden und Kultur liegenden Objektfilms auf das Wachstum von Bakterien. *Zbl. f. Bakt. I. Orig.* 156, 381—384 (1951).
2227. Hercik, F.: Die Struktur des Bakteriophagen. *Časopis lékařů českých* 90, 925 (1951).
2228. Hottle, G. A., Morgan, C., Peers, J. H., und Wyckoff, R. W. G.: The electron microscopy of rabies inclusion (Negri) bodies. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 77, 721—725 (1951).
2229. Houwink, A. L.: Caulobacter versus Bacillus spec. div. *Nature* 168, 654 (1951).
2230. Ito, Y., Ito, T., Sasaki, Y.: An electron microscope study of the infective agent of Trachoma. *Brit. J. Ophthalmology* 35, 553—559 (1951).
2231. Jensen, D. D., und Gold, A. H.: A virus ring spot of odontoglossum orchid: symptoms, transmission, and electron microscopy. *Phytopathology* 41, 648 bis 653 (1951).
2232. Johnson, J.: Virus particles in various plant species and tissues. *Phytopathology* 41, 78—93 (1951).
2233. Kilham, L., Morgan, C., und Wyckoff, R. W. G.: The electron microscopy of chick embryo membranes infected with Newcastle disease. *J. Immunol.* 67, 523 bis 528 (1951).
2234. Köhler, E., und Bode, O.: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kartoffel-X-Virus. *Naturwiss.* 38, 355 (1951).
2235. Köhler, E., und Bode, O.: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Tabakmosaikvirus. *Die Naturwiss.* 38, 431 (1951).
2236. Labaw, L. W.: The origin of phosphorus in *Escherichia coli* bacteriophages. *J. Bacteriol.* 62, 169—173 (1951).
2237. Lépine, P., Croissant, O., Cornuet, P., und Martin, G.: Essais d'extraction du virus de la Mosaïque du Dahlia (*Marmor Dahliae* Holmes) et examen au microscope électronique des produits obtenus. *Ann. Inst. Pasteur* 80, 669 (1951).
2238. Leyon, H.: Some physico-chemical properties of spontaneous mouse encephalomyelitis virus strain F. A. *Exper. Cell. Res.* 2, 207 (1951).
2239. Mallett, G. E., Koffler, H., und Rinker, I. N.: The effect of shaking bacterial flagella and motility. *J. Bacteriol.* 61, 703—708 (1951).
2240. Markham, R.: Physicochemical studies of the turnip yellow mosaic virus. *Discussions of the Faraday Society* no. 11, 221—227 (1951).
2241. Marshak, A.: Chromosome structure in *Escherichia coli*. *Exper. Cell. Res.* 2, 243—251 (1951).
2242. Moller, V., und Birch-Anderson, A.: Some morphological changes caused by various treatments of bacteria, as studied by electron microscopy. *Acta pathol. microbiol. Scand.* 29, 132—143, (1951).
2243. Morton, H. E., Rake, G., und Rose, N. R.: Electron microscope studies of treponemes. III. Flagella. *Amer. J. Syph. Gonorrhea and Venereal Diseases* 35, 503—516 (1951).
2244. Mudd, Sr., Winterscheid, L. C., DeLamater, E. D., und Henderson, H.: Evidence suggesting that the granules of Mycobacteria are mitochondria. *J. Bacteriol.* 62, 459—475 (1951).
2245. Mudd, S., und andere: Further evidence of the existence of mitochondria in bacteria. *J. Bacteriol.* 62, 729—739 (1951).
2246. Nauck, E. G.: Blutparasiten in neuem Lichte. *Umschau* 51, 240—241 (1951).
2247. Newton, N.: Some effects of high-intensity ultrasound on tobacco mosaic virus. *Science* 114, 185 (1951).
2248. Reagan, R. L., Schenck, D. M., und Brueckner, A. L.: Morphologic observations by electron microscopy of the Leon strain of poliomyelitis virus. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 77, 42—43 (1951).
2249. Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.: Electron micrographs of Newcastle disease virus preparations from chick embryos following infection by virus

- propagated in the short-tailed shrew. (*Blarina brevicauda*.) Proc. Soc. exper. Biol. Med. 78, 497—499 (1951).
2250. *Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.*: Morphological observations by electron microscopy of West Nile virus after propagation in the Swiss mouse. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 78, 630 bis 631 (1951).
2251. *Reagan, R. L., Smith, E. J., und Brueckner, A. L.*: Electron micrographs of Newcastle virus propagated in the cave Bat. J. Bacteriol. 61, 37—40 (1951).
2252. *Rhian, M., Evans, A. S., und Melnick, J. L.*: The interaction of influenza virus and intact human erythrocytes observed by replica technique in the electron microscope. J. Immunology 67, 513 bis 521 (1951).
2253. *de Robertis, E., und Franchi, C. M.*: Electron microscope observation on the fine structure of bacterial flagella. Exper. Cell. Res. 2, 295—298 (1951).
2254. *Roegner-Aust, S., und Schleich, F.*: Zur Ätiologie einiger Fischkrankheiten. Z. f. Naturforsch. 6b, 448—451 (1951).
2255. *Roemer, G. B., und Grün, L.*: Morphologische Veränderungen an Sporen unter dem Einfluß verschiedener Sterilisationsverfahren. Die Medizin. Welt 20, 1615—1617 (1951).
2256. *Peters, D.*: Blutparasiten im Elektronenmikroskop. Mikrokosmos 41, Heft 3 (1951).
2257. *Pezold, F. A.*: Zur Frage des bakteriellen Effektes der Ultraschallwellenenergie im tierischen Gewebe. Ärtzl. Wochenschr. 6, 108—112 (1951).
2258. *Pratt, A. W., und Kahler, H.*: Electron microscopy of crystalline plates in rabbit papilloma. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 76, 656—659 (1951).
2259. *Salton, M. R. J., und Horne, R. W.*: Studies of the bacterial cell wall. I. Electron microscopical observations on heated bacteria. Biochim. Biophys. Acta 7, 19—42 (1951).
2260. *Salton, M. R. J., und Horne, R. W.*: Studies of the bacterial cell wall. II. Methods of preparation and some properties of cell walls. Biochem. Biophys. Acta 7, 171—197 (1951).
2261. *Schramm, G., und Wiedemann, M.*: Größenverteilung des Tabakmosaikvirus in der Ultrazentrifuge und im Elektronenmikroskop. Z. f. Naturforsch. 6b, 379—383 (1951).
2262. *Smith, K. M., und Wyckoff, R. W. G.*: Electron microscopy of insect viruses. Research 4, 148—155 (1951).
2263. *Watson, J. H. L., Angulo, J., León-Blanco, F., Verela, G., und Wedderburn, C. C.*: Electron microscope observation of flagellation in some species of the genus *treponema schaudinn*. J. Bacteriol. 61, 455—461 (1951).
2264. *Weibull, C.*: Bacterial flagella as fibrous macromolecules. Discussions of the Faraday Society No. 11, S. 195—199 (1951).
2265. *Weidel, W.*: Über die Zellmembran von *Escherichia coli* B. I. Präparierung der Membranen. Analytische Daten. Morphologie. Verhalten der Membranen gegenüber den Bakteriophagen der T-Serie. Z. f. Naturforsch. 6b, 251—259 (1951).
2266. *Williams, R. C., und Steere, R. L.*: Electron microscopic observations on the unit of length of the particles of tobacco mosaic virus. J. Amer. chem. Soc. 73, 2057 (1951).
2267. *Williams, R. C., Backus, R. C., und Steere, R. L.*: Macromolecular weights determined by direct particle counting. II. The weight of the tobacco mosaic virus particle. J. Amer. chem. Soc. 73, 2062 (1951).
2268. *Winkler, A., Knoch, M., und König, H.*: Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von Bakterien. Die Naturwiss. 38, 241—247 (1951).
2269. *Wyckoff, R. W. G.*: Visualizing macromolecules and viruses. Amer. Scientist 39, 561—576 (1951).
2270. *Wyckoff, R. W. G.*: Possible immature forms of bacteriophage. Experientia 7, 298—299 (1951).
2271. *Wyckoff, R. W. G.*: Electron microscopy of chick embryo membrane infected with PR-8 influenza. Nature 168, 651 (1951).
2272. *Wyckoff, R. W. G.*: The fine structure of protoplasm in healthy and virus-diseased cells. Discussions of the Faraday Society No. 11, 230—235 (1951).
2273. *Yamafuji, K., Tokuyasu, K., und Wada, K.*: Electron micrography of polyhedra from silkworms. Enzymologia 15, 31 bis 32 (1951).
2274. *Backus, R. C.*: Spraying of particulated suspensions containing infective materials for electron micrographic analysis. Science 115, 246—248 (1952).
2275. *Banfield, W. G., Bunting, H., Strauß, M. J., und Malmick, J. L.*: The morphology and development of molluscum contagiosum from electron micrographs of thin sections. Exper. Cell Res. 3, 373—381 (1952).

2276. *Bang, F. B.*: Cellular pathology of virus infections as seen with the electron microscope. *Annals New York Acad. Sciences* 54, 892—901 (1952).
2277. *Bartholomew, J. W.*, und *Mittwer, T.*: Cellular structure as revealed by ultraviolet photolysis and the electron microscope. *J. Bacteriol.* 64, 1—8 (1952).
2278. *Bassermann, F. J.*: Beitrag zum Nachweis von Kernaquivalenten in Tuberkelbazillen. *Zbl. f. Bakt. Orig.* 158, 104—105 (1952).
2279. *Bergold, G. H.*: Demonstration of the polyhedral virus in blood cells of silkworms. *Biochem. et Biophys. Acta* 8, 397—400 (1952).
2280. *Bird, F. T.*: On the multiplication of an insect virus. *Biochem. et Biophys. Acta* 8, 360—368 (1952).
2281. *Bisset, K. A.*: The evidence for mitotic spindels in bacteria. *Science* 116, 154 bis 155 (1952).
2282. *Bolt, W.*, *Küchenhoff, O.*, und *Vogel, T.*: Quantitative Untersuchungen über die Bindungsverhältnisse von Grippevirus an der Hühnererythrozytenmembran. *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Technik* 60, 364—368 (1952).
2283. *Bradfield, J. H. G.*, und *Cater, D. B.*: Electron-microscopic evidence on the structure of spirochaetes. *Nature* 169, 944—946 (1952).
2284. *Breese, S. S. Jr.*, *Gochenour, W. S. Jr.*, und *Yager, R. H.*: Electron microscopy of leptospiral strains. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 80, 185—188 (1952).
2285. *Briefs, A.*, und andere: Physical properties of two group A Coxsackie (herpangina) viruses when propagated in eggs and mice determined by ultracentrifugation and electron microscope. *J. Bacteriol.* 64, 237—246 (1952).
2286. *Bringmann, G.*: Licht- und elektronenmikroskopische Studien an Antibiotikal-Formen von Coli-Bakterien. *Zbl. f. Bakt. I. Orig.* 157, 577—585 (1952).
2287. *Bringmann, G.*: Vergleichende Darstellung der Kernäquivalente von Colibakterien im lichtmikroskopischen Färbeverfahren, im Phasenkontrast- und Elektronenbild. *Zschr. f. Hygiene* 134, 219—232 (1952).
2288. *Bryant, M. P.*: The isolation and characteristics of a spirochete from the bovine rumen. *J. Bacteriol.* 64, 325 bis 335 (1952).
2289. *Calvin, M.* und *Lynch, V.*: Grana-like structures of *Synechococcus cedorum*. *Nature* 169, 455—456 (1952).
2290. *Crocker, T. T.*, und *Bernett, B. M.*: Electron microscopic counting of elementary bodies of the virus of meningo-pneumonitis. *J. Immunol.* 69, 183—186 (1952).
2291. *Dmochowski, L.*, und *Passey, R. D.*: Attempts at tumor virus isolation. *Annals New York Acad. Sciences* 54, 1035 bis 1066 (1952).
2292. *Dutky, S. R.*, und *Gooden, E. L.*: Coxielle popilliae, *N. Sp.*, a rickettsia causing blue disease of Japanese beetle larvae. *J. Bacteriol.* 63, 743—750 (1952).
2293. *van den Ende, M.*, und andere: The bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa* filtration measurements and electron microscopy. *J. of Hyg.* 50, 12—20 (1952).
2294. *Enell, H.*, *Lingen, Chr.*, *Melin, K. A.*, und *Hedman, S.*: Elektronenmikroskopische Studien an Tuberkelbazillen. *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn.* 60, 381—385 (1952).
2295. *Epstein, B.*, *Reissig, M.*, und *DeRobertis, E.*: Studies by electron microscopy of thin sections of infectious mycomatosis in rabbits. *J. Exper. Med.* 96, 347 bis 354 (1952).
2296. *Gaylord, W. H. Jr.*, *Malnick, J. L.*, und *Bunting, H.*: Intracellular development of vaccina virus. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 80, 24—27 (1952).
2297. *Gross, L.*, *McCarty, K. S.*, und *Gessler, A. E.*: The significance of particles in human milk. *Annals New York Acad. Sciences* 54, 1018—1034 (1952).
2298. *Grün, L.*, und *Kesseler, E.*: Zur Morphologie der Bakterien unter dem Einfluß von Antibiotika und Chemotherapie. *Arzneimittel-Forschung* 2, 371—375 (1952).
2299. *Haussmann, H. G.*, *Kehler, H.*, und *Koch, A.*: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an wärme- und ultraschallgeschädigten Bakterien. *Z. f. Hyg.* 134, 565—572 (1952).
2300. *Hennessen, W.*: Veränderungen an gramnegativen Stäbchen unter Mangelbedingungen. *Z. f. Hyg.* 133, 561—568 (1952).
2301. *Hercik, F.*: Über die Struktur des Bakteriophagen. *Vesmir* 31, 3—4 (1952).
2302. *Hercik, F.*, und *Hradečna, Z.*: Phagen-Bakteriolyse ohne Vermehrung der Phagen. *Československá Biologie* 1, 85—90 (1952).
2303. *Herriott, R. M.*, und *Barlow, J. L.*: Preparation, purification, and properties of E. coli virus T₂. *J. Gen. Physiol.* 36, 17—28 (1952).

2304. *Hoster, M. S., Winkle, Q. van, Rabatin, J. D., und Hoster, H. A.:* s. Nr. 2052.
2305. *Hotchin, J. E., Dawson, I. M., und Elford, W. J.:* The use of empty bacterial membranes in the study of the adsorption of Staphylococcus K phage upon its host. *Brit. J. exper. Pathol.* 33, 177—182 (1952).
2306. *Hughes, K. M.:* Development of the inclusion bodies of a granulosis virus. *J. Bacteriol.* 64, 375—380 (1952).
2307. *Kahler, H., und Lloyd, B. J. Jr.:* Electron microscopic study of the Shope papilloma virus. *J. Nat. Cancer Inst.* 12, 1167—1175 (1952).
2308. *Kellenberger, E.:* Die Einflüsse verschiedener Präparationsmethoden auf *E. Coli B*. *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn.* 60, 408—418 (1952).
2309. *Kellenberger, E.:* Les nucléoides de *Escherichia coli* étudiés à l'aide du microscope électronique. *Experientia* 8, 99—105 (1952).
2310. *Kellenberger, G., und E.:* La lysogénie d'une souche *Bacillus cereus*. Mise en évidence par le microscope électronique. *Schweiz. Z. f. allgem. Pathol. u. Bakteriol.* 15, 225—233 (1952).
2311. *Kellenberger, E.:* Les transformations des nucléoides de *Escherichia coli* provoquées par les rayons ultra-violet. *Experientia*, 8, 263 (1952).
2312. *Lanham, U. N.:* Observations on the supposed intracellular symbiotics microorganisms of aphides. *Science* 115, 459—460 (1952).
2313. *Melnick, J. L.:* und andere: Electron microscopy of viruses of human papilloms, *Molluscum contagiosum*, and *vaccinia*, including observations on the formation of virus within the cell. *Annals New York Acad. Sciences* 54, 1214—1225 (1952).
2314. *Mollaret, P., und Cateigne, O.:* Isolement d'un ultra-virus dans un cas de méningite endothélio-leucocytaire multirécurrenente bénigne. *C. R. Acad. Sci. Paris* 235, 269—271 (1952).
2315. *Mudd, S., Beutner, E. H., Hillier, J., und Hartmann, P. E.:* Nuclei and mitochondria in *Escherichia coli* cells infected with T 2 bacteriophage (*Soc. Proc.*) *J. Nat. Cancer Inst.* 13, 241 bis 243 (1952).
2316. *Murphy, J. S., und Bang, F. B.:* Observations with the electron microscope on cells of the chick chorio-allantoic membrane infected with influenza virus. *J. exper. Med.* 95, 259—268 (1952).
2317. *Noda, H., und Wyckoff, R. W. G.:* The electron microscopy of developing bacteriophage. III. Techniques to visualize developing forms. *Biochim. et Biophys. Acta* 8, 381—388 (1952).
2318. *Peters, D., und Wigand, R.:* Neue Untersuchungen über *Bartonella bacilliformis*. *Z. f. Tropenkrankheiten und Parasitologie* 3, 313—326 (1952).
2319. *Raettig, H.:* Experimentelle Untersuchungen über Entwicklungsvorgänge bei Bakteriophagen. Die polyvalenten Bakteriophagenstämme in Darmschleimen von Mensch und Tier. *Zbl. f. Bakteriol. Abt. I, Orig.* 158, 34—53 (1952).
2320. *Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.:* Electron microscope studies of four strains of infectious bronchitis virus. *Amer. J. Vet. Res.* 13, 417—418 (1952).
2321. *Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.:* Morphological observations by electron microscopy of the Lansing strain of poliomyelitis virus after propagation in the Swiss albino mouse. *Texas Rep Biol. Med.* No. 2, 425—428 (1952).
2322. *Reagan, R. L., und andere:* Morphological observations by electron microscopy of „B“ virus after propagation in the rabbit. *Cornell Vet.* 42, 328—331 (1952).
2323. *Reagan, R. L., und Brueckner, A. L.:* Studies of dengue fever virus by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 64, 233 bis 235 (1952).
2324. *Rose, N. R., und Morton, H. E.:* The cultivation of treponemes with the preservation of characteristic morphology. *Amer. J. Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases* 36, 1—16 (1952).
2325. *Rose, N. R., und Morton, H. E.:* The morphologic variation of treponema. *Amer. Journ. of Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases.* 36, 17—37 (1952).
2326. *Ruska, H., Bringmann, G., Neckel, I., und Schuster, G.:* Über die Entwicklung sowie den morphologischen und zytochemischen Aufbau von *Mycobacterium avium* (Chester). *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Technik* 60, 425—447 (1952).
2327. *Ruziczka, O., und Orth, E.:* Alterations morphologiques du bacilli tuberculeux consécutives à l'action de divers médicaments. Etude au microscope électronique. *Ann. Inst. Pasteur* 82, 334 bis 336 (1952).
2328. *Schachmann, H. K., Pardee, A. B., und Stanier, R. Y.:* Studies on the macromolecular organization of microbial cells. *Arch. Biochem.* 38, 245—260 (1952).
2329. *Schlipköter, H. W., und Grün, L.:* Altersbedingte morphologische Verände-

- rung an Leptospiren. Arch. Hyg. und Bakteriolog. 136, 211—217 (1952).
2330. Schlossmann, K., und Hedman, S.: Elektronenoptische Befunde an Bakterienzellen unter dem Einfluß der Patientensera. Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn. 60, 386—392 (1952).
2331. Schuster, G. P. K.: Einige licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Malleomyces mallei* (Pribram). Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn. 61, 101—105 (1952).
2332. Sharp, D. G., Eckert, E. A., Burmester, B. R., und Beard, J. W.: Particulate component of the plasma of fowls with avian lymphomatosis. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 79, 204—208 (1952).
2333. Sharp, D. G., Eckert, E. A., Beard, D., und Beard, J. W.: Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leucosis and a comparison with the agent of Newcastle disease. J. Bacteriol. 63, 151—161 (1952).
2334. Starr, N. P., und Williams, R. C.: Helical fine structure of flagella of a motile diphtheroid. J. Bacteriol. 63, 701—706 (1952).
2335. Wigand, R., und Peters, D.: Unbekannter Mikroorganismus aus der Luft. Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn. 60, 405—407 (1952).
2336. Williams, R. C.: High-resolution electron microscopy of the particles of tobacco mosaic virus. Biochim. et Biophys. Acta 8, 227—244 (1952).
2337. Van der Want, J. P. H., und Rozendaal, A.: An electron microscope study of the virus causing rattle disease of tobacco and stem-mottle of potato. Tijdschr. Plantenziekt. 54, 134—141 (keine Jahresangabe).

Autorenregister

Amprino, R., 78.

Baer, J. G., 150.

Bancher, E., 61.

Barer, R., 417, 418.

Bargmann, W., 149.

Baud, C. A., 290.

Bennet, A. H., 417.

Berninger, H., 44.

Bode, F., 350.

Boehm, G., 148, 149.

Bonanome, A., 298.

Borries, B. v., 106, 253, 306, 448.

Bräutigam, F., 53.

Brugge, H. J. F., van der, 61.

Buchwald, E., 374.

Cholnoky, B. v., 62.

Clara, M., 57.

Claussen, C. H., 406.

Clemens, H. J., 364.

Crossmann, G. C., 74.

Crossmon, G. C., 77, 78.

Dalitz, V. Ch., 292.

Debrunner, H. U., 419.

Dettmer, N., 423.

Dimond, A. E., 62.

Douglass, P. C., 74.

Drawert, H., 64, 82.

Duhm, B., 259.

Eicke, R., 302.

Elias, H., 213

Eulig, H.-G., 201

Fairs, G. L., 59.

Flakenhagen, H., 416.

Franke, H., 149, 421.

Frazier, W. C., 375.

Freund, H., 50, 416.

Frey-Wyssling, A., 76.

Fritz, A., 373.

Geiger, F., 33, 73.

Geitler, L., 229.

Gentil, K., 95.

Gönnert, R., 53.

Gössner, W., 377.

Gottschalk, W., 81.

Gottschewski, G. H. M., 185.

Grabner, A., 53.

Graumann, W., 77, 225, 361.

Gray, P., 59.

Gurr, G. T., 420.

Haase, M., 418.

Haberlandt, H., 420.

Härtel, O., 9.

Harders, H., 76.

Hartmann-Fahnenbrock, M., 439.

Hartshorne, N. H., 60.

Hansen, H.-G., 376.

Haselmann, H., 77.

Hauser, J., 421.

Hell, A., 276.

Helmcke, J. G., 83.

Hepner, W., 421.

Hirsch, Th. von, 68, 337.

Hirschler, J., 414.

Höfler, K., 62, 63, 79, 82, 228, 230.

Hofmeister, F. L., 79.

Huber, B., 229.

Hütter-Kanert, M., 81.

Jahn, B., 294.

Jebsen-Marwedel, H., 60, 223.

Jupnik, H., 417.

Kenda, G., 62, 373.

Kisch, A. J., 59.

Kisser, J., 228.

Kistner, A., 60.

Kling, W., 439.

Knight, S. G., 375.

Kölbel, H., 142.

Krauter, D., 222.

Krebs, J., 228.

Krieger, W., 83.

Küster, E., 53, 70, 71.

Kvam, Th., 65.

Langeron, M., 55.

Lapage, G., 148.

Larsen, P., 229.

Lelli, G., 298.

Lennert, K., 20.

Lenz, F., 92.

Leonhardt, H., 137.

Levan, A., 422.

Lipp, W., 38.

Lippert, W., 95, 172.

Loub, W., 373.

Ludwig, K. S., 321.

Luhan, N., 80.

Marotzke, R., 429.

Matthes, E., 58.

Matthey, R., 57.

Mayer, H. Th., 48.

Menzel, E., 419.

Metzner, H., 81.

Meyer, W., 56.

Meyer-Arendt, E., 354.

Meyer-Arendt, J., 354.

Michel, K., 376.

Mohler, H., 54.

Molè-Bajer, J., 81.

Moller, W., 370.

Mond, W., 201.

Morard, J. C., 290.

Neumann, K., 420.

Osterberg, H., 417.

Pardatscher, G., 62.

Patzelt, V., 52, 54.

Perner, E., S., 80.

Pernoux, E., 290.

Petry, G., 66, 121.
 Pfefferkorn, G., 239, 270.
 Pfeiffer, H. H., 421.
 Piper, A., 60.
 Polge, C., 58.
 Puff, A., 210.

Raettig, H., 280.
 Rahn, J., 386.
 Reichardt, H., 60.
 Reichenow, E., 421.
 Reichert, K., 419.
 Rich, S., 62.
 Richards, A. G., 150.
 Richards, O. W., 417.
 Rijven, A. H. G. C., 80.
 Rippel-Baldes, A., 82.
 Rominger, A. 376.
 Ruska, E., 152.
 Ruska, H., 106, 253, 306,
 448

Sandritter, W., 30.
 Sappa, M., 298.
 Sarles, W. B., 375.
 Schindler, H., 82.

Schmidt, W. J., 148.
 Schneiderhöhn, H., 375.
 Schuchardt, E., 78.
 Schulze, H. L., 63.
 Schummer, A., 58.
 Schuster, G. P. K., 101.
 Schwarz, W., 78, 328, 423.
 Schwöbel, W., 75, 420.
 Sin Min Tung, 229.
 Skuhra, H., 228.
 Smiles, J., 58.
 Smith, A. U., 58.
 Smith, G. M., 51.
 Soares, A. D., 59.
 Sobels, J. C., 61.
 Söding, H., 227.
 Spanier, E. H., 213.
 Stiegler, A., 61.
 Stoddard, E. M., 62.
 Stuart, A., 60.
 Subramaniam, M. K., 64.

Thaler, J., 373.
 Thiele, H., 75.
 Tietz, H., 129.
 Tjio, Joe Hin, 422.

Toth, A., 82.
 Toth, H., 80.
 Tröger, W. E., 376.

Vester, G., 328.
 Vogel, H., 74.
 Voigt, G. E., 1.

Wagner, E., 81.
 Walz, W., 74.
 Weber, E., 227.
 Weber, F., 62, 63, 373.
 Weitzel, G., 20.
 Werner, R., 419.
 Wess, G., 59.
 Westermann, H., 270.
 Wilson, J. B., 375.
 Wohlfahrt-Bottermann
 K. E., 239.
 Wolff, O., 180.
 Wulff, H. D., 229.

Zander, E., 74.
 Zbinden, G., 231.
 Zeiger, K., 76.
 Ziegenspeck, H., 227.

Sachverzeichnis

A-Zellen 39.
 Abbildung, Phasenkontrast-Verfahren 76
 Abdruckverfahren, Holzbeobachtung 292.
 Acetalphosphatide 9.
 Acetonchloroform 203
 Acridinorange 9
 Adrenalin 202
 Adsorption d. Phosphormolybdänsäure an
 Elastin 125.
 Äquatorkrümmung, Kugeln 211.
 Äthylenglycol 130.
 Algen, Hochmoor 62.
 —, Kunde 51.
 —, Resistenz, Vitalfärbung 373.
 —, Zellen, Vitalfärbung 82.
 Allergische Reaktionen 59.
 Alkohole, Färbbarkeit 29.
 Alterung des Knorpels 235.
 Alveolen, Lunge 263.
 Aminosäuren 271.

Amyloidnephrose 4.
 Anatomie, Holz 50.
 —, Mensch 149.
 —, protoplasmatische 18.
 Anfertigung v. Schnittbändern 133.
 Anisotropie d. Elastinfaser 126.
 Anthochlore, Nachweis 228.
 Anthocyankörper, *Pelargonium zonale* 82.
 Argentaffinität 2, 38.
 Argrophilie, Struktur 42, 38.
 Arthropodenintegument, Entwicklung 151.
 —, chem. Zusammensetzung 150.
 —, Mikroanatomie 151.
 —, Permeabilität der Cuticula 151.
 Ascorbinsäure 17.
 Asphyxie-Effekt 17.
 Aufrichtmikroskopie 74.
 Auflösungsvermögen, Elektronenmikroskopie
 231.
 Auftauen, Beobachtung 58.

- Augenoptik, Fachlehre 418.
 —, Pigment 148.
 —, Region (Rückenschwimmer) 190.
 Auramin 142
 Ausschleuderungsprozeß d. Nesselkapseltrichocysten 246.
 Austrocknung durch Gefrieren 298
 Autoradiographien 130.
 Azanfärbung 185.
 Azetylcholin 202.
- Bakterien**, Formwechsel 196.
 Bakteriophagen-Bakteriengemisch 281.
 —, Filmbewuchsverfahren 280.
Balaenoptera musculus 233.
 Basophilie 30.
 Bauer'sche Polysaccharidreaktion 325.
 Bebrütungszeit 281.
 Benetzungsmittel 232.
 Benzol, Intermedium 204.
 Berberinsulfat, Vitalfärbung 80.
 Best'sche Methode zur Glykogendarst. 324
 Biene, Bau 74.
 Bindegewebe, Kollagen 231.
 Binokularmikroskop 406.
 Biogenese, Grundlagen 74.
 Bleitetraacetat 361.
 Blutkörperchen, Darstellung im Phasenmikroskop 193.
 Bowmannsche Kapsel 194.
 Brechungsindex 192.
 Bresslau'sche Tusche, Methode 240.
Bromeliaceen, Schließzelle 62.
 Bürzeldrüse 20.
- Caedax**, Einbettungsmittel 206.
 Capronsäure 23.
Capsella bursa pastoris, Nährlösungen 80.
 Carmin-Eisessig Färbung 185.
 Cellodal 44.
Ceranium, Tüpfel 81.
 Cerebroside 22.
 Cresylechtviolett 384.
 Chitin 98.
 Cholesterin 22.
 Chondriosomen, Darstellung im Phasenkontrast 193.
 Chondroitinschwefelsäure 382.
 Chondromucoidsubstanz 233.
 Chloroplasten, Nucleinsäure 81.
 Chromosomen 57.
 Chromosomenmutation, Pachytaen 81.
 Coli-Bakterien (gramnegativ) 198.
 Cremolan, wasserlöstl. Einbettungsmittel 328.
- Crown gall 62.
 Cuticula, Flimmerbesatz 194.
 Cysticeten (Virusgruppe) 265.
- Dahlia** 62.
 Deckgläser, Dunkelfeldmikroskopie 60.
 Dehydration elastischer Fasern 123.
 Del-Rio-Hortega Silberfärbung 194.
 Denaturierung von Eiweißbausteinen 123.
 Desmidiaceen, Protoplasten, Osmose, Plastidenkonsistenz 228.
 2,6-Dichlorphenolindophenol (DPIP) 13.
 Dickenmessung, Dreistrahlinterferenz 419.
 Differenzierung des Protoplasmas 194.
 Discushernie 235.
 Dispersionsfarben, Dunkelfeld 78.
 —, Phasenkontrastmikroskopie 78.
 —, textile fibers 74.
 Doppelbrechung an Muskelfasern 421.
 Doppelbrechung, *Mycobakterium tuberculosis* 148.
 Drüsenhaare, *Verbascum Blattaria* 9.
 Dunkelfeld, Korund 77.
 Dunkelkontrast 186.
- Einbettung in Cellodal 44.
 Einbettungsmittel 59.
 —, Euparal 49.
 Einstellupe, Phasenkontrastmikroskopie 187.
 Elastin, Fixierung 121, 122, 125.
 Elektronen, Geschwindigkeit 154.
 Elektronenmikroskopie 231.
 —, Färbung 423.
 —, Kontrastfärbung 240.
 —, Linsen, magnetostatische 152.
 —, Strahlen
 Emissionsspannung 240.
 Endoderme, Endodermoide, Fluorochromierung 277.
 Endothelkerne in d. Rattenmiere 193.
 Entkalkung von Knorpel 232.
 Entwicklungsgeschichte, Mensch 57.
 —, Zähne 56.
 Epithelkerne, als Kugeln betrachtet 193.
 Erythrozyten 194.
 Erzmikroskopisches Praktikum 375.
Euastrum, Osmose, Plastidenkonsistenz 228.
Euglena olivacea, Physiologie 227.
Eunotia arcus, Kopulation, Formwechsel 229.
 Explantat mit extrazellulären Fasern 231.
- Färbemethoden, biologische 420.
 Färbung nach Cremolan-Einbettung 328.
 —, elastischer Fasern 66.

- Färbung, Zellkern 229.
 Farbabhängigkeit der Vergrößerung beim Elektronenmikroskop 172.
 Farbionenpermeabilität, Tonoplasten 230.
 Farbblösung nach Einarson 32.
 Farbstoffspeicherung 9.
 Fasernetz des hyalinen Knorpels 234.
 Faserstruktur der Nerven 192.
 Feldmessung mittels Falle- und Schwingspule 162.
 Fettfärbung, Methoden 20.
 —, Säuren, flüssige 24.
 — —, freie 22.
 — —, gesättigte 25.
 —, Tropfen im Meerschweincknorpel 237.
 Feulgenfärbung 185, 377.
 Fibrillen, Darstellung im Phasenmikroskop 193.
 Filmbewuchungsverfahren 280.
 Fixierungsmittel n. Bouin 131.
 Fixierungsmittel, Dielektrizitätskonstante 201
 —, nach Helly 131.
 —, osmotischer Druck 201.
 —, P_H 201.
 Flimmerbesatz der Cuticula 194.
 Flüßelschuppe von *Macroglossa* 199.
 Flughautsehne, elastische 125.
 Fluoreszenzmikroskopie 9, 53.
 —, *Hirudo medicinalis* 149.
 —, *Mycobacterium tuberculosis* 142.
 Fluorochromierung 9, 63, 80.
 —, Nervengewebe 76.
 Fluoroskopie, Endoderme, Endodermoide 227.
 —, Mineralien 420.
 Foot'sche Bindegewebsversilberung 321.
 Foraminiferenschalen 280.
 Formwarfolien 280.
 Formwechsel der Bakterien 196.
 Froscherythrozyten 202.
 Froschringerlösung 202.

 Gallocyaninchromalaun 31.
 Gallocyaninfärbung des Elastins 128.
 Gauss'sche Dioptrik 173.
 Gefäßadventitien, Färbung mit Geigyblau 140
 — endothelien, — — — 140.
 Gefrierbeobachtung 58.
 — trockenung 420.
 Geigyblau 536 als Vitalfarbstoff 137.
 Gelatine-Einbettung nach Gaskell, Heringe, u. Ten Berge 129.
 Gentianviolett 16.
 Gerbung mit pflanzlichen Gerbstoffen 126.
 Gewebeschnitte, gebeizte 342.
 Gewebezüchtung u. Phasenkontrast 194.
 Giemsa-Färbung 265.
 Gieson van, Färbung 368.
 Giroud-Reaktion 12.
 Giroud'sches Reagenz 12.
 Gitterfasern d. *Membrana propria* 194.
 Glaskörper v. Tieren, Strukturuntersuchung 78.
 Glasschmelze 60.
 Glomerulusschlingen in der Kapsel 194.
 Glykogennachweis durch Silbermethoden 321.
 Glycerin-Gelatine (Kaiser) 364.
 Granulabewegung *Parascaris equorum* 75.
 Grenzflächen-Phänomene 356.
 Griffel 132.
 Gußmodelle, Herstellungsverfahren 148.
 Guttapercha 48.

 Haare, *Verbascum*, *Blattaria* 9.
 Hämatoxylin nach Ehrlich 128.
 Hämoglobin 347.
 Hämolyse der Erythrozyten 194.
 Haloringe (Beugungsringe) 186, 194.
 Halszelle, *Verbascum Blattaria* 9.
 Harnpol des Nierenkörperchens 194.
 Hauptstückzelle d. Nierenkörperchens 194.
 Hefe-Zellen, Darstellung im Phasenkontrast 193.
 — Zellkern, 63.
 — Tetraploidie 64.
 Heparin 382.
Hirudo medicinalis, Fluoreszenz 149.
 Histologie 54.
 —, Technik 421.
 —, Zähne 328
 Histologische Schnitte im Phasenkontrastmikroskop 68.
 Hitzefixation 146.
 Hochmooralgen 62.
 Hölzer, mikroskopische Untersuchung 229.
 Hoftüpfel mit Steinkern 302.
 Hohlzylinder, achsial magnetisiert 155.
 Holzfaser, Färbung 230.
 —, Mikroskopie 51, 230.
 Holzmazeration 230.
 —, Färbung 230.
 Hyaluronidase zur Eiweißzerstörung 230.
 Hypophysenvorderlappenhormon 384.

 Idioblasten 9, 18.
 Imbibitionerscheinungen 356.
 Indigosulfonate 13.
 Inhaltsformel f. Rotationsellipsoid 210.
 Injektion, Mikro und plasmatische 79.

- Internmikrofibrillarräume 42.
 Insekten, Gerüstsubstanz 97.
 Interfibrillarsubstanz 234.
 Isotropie d. Elastinfaser im ungedehnten Zustand 126.

 Kaninchenserum 194.
 Karion „Merck“, wasserlösliches Einschlußmittel 364.
 Kakteenzellen, Viruskörper 373.
 Kern-Membran 237.
 — -Oedem, funktionelles 208.
 — -Schwellung, -Schrumpfung 202.
 — -Volumen 201, 202.
 Kieselwolframsäure 343.
 Kittsubstanz der Fibrillen 437.
 Klebkraft der Trichocysten 242.
 Klinische Laboratoriumsmethoden 149.
 Klinisch-mikroskopische Diagnostik 421.
 Knochenschliffe, Vierfüßler 78.
 Knorpel, hyaliner 231.
 —, Gewebe 231.
 —, Schnitte 231.
 Kochsalz-Eisgemisch 131.
 Kohlenwasserstoffe, Färbbarkeit 27.
 Kollagenfasern, Darstellung im Phasenkontrast 193.
 Kollodiumfilm zum Aufkleben 239.
 Kollodiumfolie 240.
 Kongorot 385.
 Kontrasteffekt dicker Objekte im Phasenkontrast 417.
 Korund, im Dunkelfeld 77.
 Kosmos-Lexikon 52.
 Kriminalistische Spurenkunde 421.
 Kristallnadeln in Protrichocysten 240.
 Kristalloptik, Einführung 374.
 Kultur von Myxomyceten 61.
 Kupfernetze als Präparatträger 259.
 Kupfer'sche Sternzellen 382.
 Kutikularanalyse 228.

 Lackabzüge 270.
 Lagerhans'sche Inseln 39.
 Langhans'sche Riesenzellen 5.
 Lebendbeobachtung 58.
 Leisten bzw. Trabekeln 95.
 Leukofuchsin 362.
 Leukozyten, neutrophile 21.
 Lichtdurchlässigkeit, Gewebe 33.
 Lipoide 129.
 Lokalisierung des Lignins, Verfahren nach P. Lange 230.
 Luft, flüssige, zur Mazeration von Geweben 231.
 Lungengewebe mit Alveolen 263.
 —, Struktur und Einfluß d. Fixierung 386.
 Lyophilisation = Austrocknung durch Gefrieren 298.
 Lymphozyten in Glissonschen Dreiecken 382.

 Magermilchgerinnung 290.
 Magnetisierung 161.
 Magnetostatische Linsen 165.
Malleomycis mallei (Rotzerreger) 101.
 Meerschweinchenkomplement 194.
 Meiose, Pollenentwicklung 81.
Melosira varians 83.
 Membran, elastische 193.
 —, semipermeable 236.
Membrana propria 194.
 Meßverfahren f. elektronenoptische Linsen 161.
 Metachromasie 12.
 Metacrylsäure s. Plexiglas 439.
 Metalle, Minerale, Schleif- und Poliertechnik 419.
 Methylenzoat zur Nachbehandlung 204.
 — -Benzol als Intermedium 208.
 Methylenblau 12, 60.
 Micellen 97.
 Mikrobiologie, Grundriß 82.
 Mikroinjektion 79.
 Mikrometer 59.
 Mikrophotographie ohne Okular 350.
 Mikroskop 52, 55.
 Mikroskopie, Braunkohle 416.
 —, Glas 81.
 —, Holz 50, 230.
 —, Kohle 416.
 —, Koks 416.
 —, kriminalistische 421.
 —, Papier 50.
 —, praktische 55.
 —, Steinkohle 416.
 Mikrotom nach Danon u. Kellenberger 232.
 Mikirurgie 61.
 Mineralien, Fluoreszenzmikroskopie 420.
 Mineralbestimmung, mikroskopische 376.
 Mischungsverhältnis des Synthawachses 132.
 Mitochondrien 237.
 Mitose 81.
 Monozyten des Menschen 21.
Morpho achilles 95.
Mycobacterium tuberculosis 142.
 — —, Doppelbrechung 148.
 Mucoitinschwefelsäure 382.
 Mukopolysaccharide 383.
 Mukoproteide 383.

- Nachweis von Anthochloren 228.
 Nährlösungen für *Capsella bursa pastoris* 80.
 Naturwissenschaft, Forscher, Lebensbilder 416.
 Nebenapparate, mikroskopische 52.
 Nekrose des Knorpels 235.
 Nervengewebe, Fluorochromierung 76.
 —, Faserstruktur 192.
 Nesselkapseltrichocysten d. Ciliaten 239.
 Neutralfette 20.
 Neutralrot 12.
 Neurohypophyse und Geigyblau 140.
 Nierenkörperchen 193.
 —, Physiologie 5.
 Nilblausulfat-Färbung 20.
 Nucleinsäuren 30.
 —, Chloroplasten 81.
 —, histochemischer Nachweis 30.
 —, photoelektrische Bestimmung 33.
 —, quantitative Bestimmung 30.
 Nucleolen, der Nierenkörperzelle 194.
 Nucleoproteide als Träger u. Aufbau-
 stanzen 30.

 Oberflächenlackabzüge 270.
 Oberflächenstruktur der Blutkörperchen 194.
 Objektträger, Dunkelfeldmikroskopie 66.
 Objektvergleich im Licht- u. Elektronen-
 mikroskop 259.
 Okular-Photozelle 34.
 Optik, chemische 54.
 Orcein-Färbung 67.
 Osmium zur Fixierung 231.
 —, Tetroxyd 20.
 Osmose, Plastidenkonsistenz 228.
 Oxychinolin 422.

 Pachytäen, Pollenmutterzellen 81.
 —, Chromosomenmutation 81.
 Papsche Bindegewebsversilberung 321.
Parascaris equorum, Granulabewegung 75.
 Pasini'sche Methode 65.
 Perchlorsäure, histochem. Nucleinsäuren-
 nachweis 377.
 Perjodsäure-Leukofuchsin 77.
Pelargonium zonale, Anthocyankörper 82.
 Penicillin-Zusatz zu Streptokokkenkulturen
 198.
 Permanentlinsen 161.
Periplaneta americana, Cuticula 134.
 Pflanzenzelle, normal 53.
 —, pathologische 53.
 —, Vitalfärbung 53.

 Phagentiter 281.
 Phasenmikroskop, Kontrasteffekt 76, 102.
 Phasenkontrastmikroskopie 76.
 —, dicker Objekte 417.
 —, Dispersion 78.
 —, histologischer Schnitte 337.
 —, Medizin 185, 376.
 —, Methodik 77.
 Phasenplatte, Vektor-Theorie 418.
 —, Ring 185.
 Phosphatide 22.
 Phosphormolybdänsäure nach Mallory 67.
 —-Wolframsäure zur „Färbung“ 231.
 Physik, Grundlagen 416.
 Physiologie 51.
 —, *Euglena olivacea* 227.
 Pigmentkörnchen 192.
 Pigmentzellen der Basalmembran 190.
 Plasmal 9.
 Plasmalemma, Plasmolyse 79.
 Plasmolyse mit Natriumkarbonat 79.
 Plastidenkonsistenz, Osmose 228.
 Plastoid-Korrosionsverfahren 58.
 Platinblenden 259.
 Pneumokokken, (grampositiv) 198.
 Polarisationsmikroskopie 60.
 Polkrümmung an Kernen 211.
 Pollenentwicklung, Meiose bei Rebsorten 81.
 —, Keimung 229.
 Pollenmutterzelle (*Solanum lycopersicum*),
 Pachytaen 81.
 Polschuhsystem 158.
 Polyamine 39.
 Polyäthylenglycol „Carbowax“ 130.
 Polyvinyl-Alkohole 59.
 —-Acetat 49.
 —-Derivate 59.
 Porzellanoberflächen 439.
 Präparationstechnik, Stechmücken 60.
 Präparatveränderungen bei der Elektronen-
 mikroskopie 270.
 Primärkeime, Silberschichten 1, 38.
 Pritschard'sche Silberreaktion 325.
 Prontosil solubile, Vitalfarbstoff 82, 71.
Prorodon, Gattung der Ciliaten 239.
 Propylenglycol 130.
 Protoplasma, Differenzierung 194.
 — der Knorpelzelle 236.
 Protoplast, Fluorochromierung 63.
 Protozoenkunde, 421.
 Protrichocysten der Ciliaten 239.
 Purinringe 30.
 Pyrimidinringe 30.

- Quebracho 126.
 Quecksilberhöchstdrucklampe 143.
 Querstreifung in kollagenen Fasern 231.
 Rattenmiere 193.
 Redox-Indikatoren 12.
 Refraktionsindex 358.
 Regelbare, magnetostatische Linsensysteme 168.
 Resistenz gegen Vitalfarbstoffe 373.
 Resorein-Fuchsin z. Elastinfärbung 123.
 Retraktionskraft der elastischen Faser 127.
Rhipsalis 63.
 Ribonuclease bzw. Desoxyribonuclease 377.
 —, Herstellung nach Brachet 32.
 Rinderdasselfliege, Cuticula (*Hypoderma bovis*) 135.
 Ringscheibe, radial magnetisiert 155.
 Rippenknorpel d. Neugeborenen 233.
 Rohrmagneten 161.
 Rosenbastarde, Zytologische Beobachtung 229.
 Rotationsellipsoid, Inhaltsformel 210.
 Rückenschwimmer, Augenregion 190.
 Safranin 12.
 Sanio'sche Balken 302.
 Schattennegativ 277.
 Schiff-Reaktion 9.
 Schiff'sche Aldehydreaktion 17.
 Schilddrüse, vom Mensch 355.
 Schildknorpel 233.
 Schillersuppen vom Schmetterling 95.
Schistosoma mansoni (Trematoden) 262.
 Schleif- und Poliertechnik f. Metalle u. Minerale 419.
 Schließzellen 62.
 Schmelzharzmontage 48.
 Schnelleinbettungsmethode mit Synthawachs-Gemischen 129.
 Schnellfixierung, Lunge 403.
 Schnitt-Schall-Präparat nach Wolpers 425.
 Schrifttum der Elektronenmikroskopie 106, 253, 306, 448.
 Schrumpfungstendenz der Kerne 207.
 — des Protoplasmas 236.
 Schwingteller 183.
 Schwingungsfrequenz 181.
 Sehnervenzone des Rückenschwimmers 190.
 Sehzellen des Rückenschwimmers 190.
 Sehzellenkerne, Vermessung 210.
 Seifenmicelle, Gestaltsänderung 75.
 Siebplatten bei Foraminiferen 296.
 Siemens-Beschallgerät 180.
 Silberfärbung, s. Primärkeime 321.
 —, nach Del-Rio-Hortega 75.
 Silberimprägnation, nach Wilder 1, 38, 65.
 Spannungsdifferenzen zwischen Muskulatur, Kollagen, Elastin 124.
 Spannungsteilerregelungen 158.
 Speichelprobe, zum Glykogennachweis 321.
 Spezialkondensor nach Heine 185.
 Spiegelkörper 185.
Solanum tuberosum, Wurzel, Sproß, Blatt 134.
 Sol-Gel, Umwandlung 291.
 Spülmittel, neutrale 441.
 Stabilisation d. Lackmatrize mittels Aufdampfschichten 271.
 —, Magnet 161.
 Stärke-Glyzerinagar 101.
 Staubmeßgeräte und Verfahren 76.
 Stechmücke, Präparationstechnik 60.
 Stielzelle, *Verbascum*, *Blattaria* 9.
 Streptokokken 198.
Substantia propria des Trommelfells 429.
 Sudan III 21.
 Sudanschwarz B 21.
 Suprareninlösung 203.
 Susa-Fixierung 204, 263.
 Tageslicht, Einfluß 61.
 Tektinstäbchen = Protrichocysten 240.
 Teres-Typ (Prorodon) 242.
 Tetraploidie 64.
 Terpeneol als Intermedium 332.
 Textile fibers 74.
 Theoretische Physik, Grundlagen 416.
 Thionin 13.
 Thymol 133.
 Tierische Parasiten 148, 150.
 Toluidinblau-Färbung 82.
 —, Algenzellen 82.
 Toluylenblau 13.
 Tonauszug der Lichter = Lichternegativ 277.
 Tonoplasten, Farbstoffenpermeabilität 230.
 Tontrennverfahren f. Papierkopien v. elektronenmikrosk. Aufnahmen 277.
 Torpedo 138.
 Trabekeln = Leisten 95.
 Trichocysten der Ciliaten 239.
 —, Faden 244.
 Triphenyltetrazoliumchlorid T T C 137.
 Trockeneis-Methylalkohol-Gemisch 131.
 Trypanblau 137.
 Trypanoplasten 63.
 Trypsin 436.
 Tunicaten 97.
Tunica intima 193.
 — *media* 193.
 Tüpfel, Ceramium 81.

- Ultraschall zur Mazeration 231.
 Ultropak 194.
 Umkehr des Farbeffektes bei Elastin 127.
 Uranylacetat zur Färbung 231.
- Vektor-Theorie, Phasenplatte 418.
 Veränderung der Kernmembran durch Fixierungsmittel 208.
 Vergrößerungsbestimmung 163.
 Verkieselung fossiler Hölzer 302.
 Vermessung d. Absorptions- und Emissionsspektrums 142.
 Verschlusvorrichtung der Kapsel 244.
 Versilberung, nach Bielschowsky-Gros 1, 40.
 — —, Gömöri 368.
 — —, Methoden 3.
 — —, Nieto 1.
 — —, Theorie 2.
Vicia faba, Wurzel, Sproß, Blatt 134.
 Viruskörper 63.
 —, Kakteenzellen 373.
 Vitalfärbung 9, 61, 62, 64, 80.
 —, Algenzellen 82.
 —, Berberinsulfat 80.
 —, mit Hämatoxylin 70.
 —, von Pflanzenzellen 70.
 —, mit Prontosil 82.
- Vitalfärbung, Resistenz der Algen 373.
 Vitalfarbstoffe, Plasmaveränderung 373.
 Vitalgranulabildung bei Geigyblau 139.
 Volumenänderung der Eiweißkörper 400.
 Volumenverminderung des Kernes 208.
 Vormagnetisierung 181.
- Wachse 20.
 Wasserbindungsvermögen der Gewebe 401.
 Wintergrünöl als Einschlußmittel 123.
 Wuchsstofflehre 227.
 Wurzelspitzen 132.
- Zackenradregelung 166.
 Zähne 56.
 Zedernöl als Intermedium 204.
 Zeissische Mikroskopobjektive 76.
 Zeitraffeinrichtung 420.
 Zelle, mikroskop. und chemische Organisation 75.
 —, Vitalfärbung 64
 Zellkern, Hefe 63.
 Zellkernbau, *Navicula radiosa* 229.
 Zusatzoptik, Kondensor 419.
 Zwischensubstanz der Knorpelzellen 237.
 Zytologie, Rosenbasterde 229.